

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**PROTEINOPATÍAS AMILOIDES: DESARROLLO DE UN  
NUEVO SISTEMA MODELO EN MICROORGANISMOS  
BASADO EN REPA-WH1**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Fátima Gasset Rosa**

Bajo la dirección del doctor

Rafael Giraldo Suárez

**Madrid, 2012**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**Proteinopatías amiloides:  
Desarrollo de un nuevo sistema modelo en  
microorganismos basado en RepA-WH1**

**Tesis Doctoral**



**Fátima Gasset Rosa**  
Madrid, 2012



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**Proteinopatías amiloides:  
Desarrollo de un nuevo sistema modelo en  
microorganismos basado en RepA-WH1**

**DIRECTOR DE TESIS:**  
Rafael Giraldo Suárez

**Tesis Doctoral**



**Fátima Gasset Rosa**  
Madrid, 2012

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS XI

### ABREVIATURAS

XII

## I. INTRODUCCIÓN

1

### 1. Proteínas amiloides: bases moleculares y estructurales

3

- 1.1. Estructura de los ensamblajes amiloides 3
- 1.2. Potencial amiloidogénico y polimórfico 4
  - 1.2.1. Predicción de secuencias amiloides 4
  - 1.2.2. Polimorfismo estructural de los amiloides 5
- 1.3. Transformación del estado nativo al estado amiloide: cinética 5

### 2. Biología del estado amiloide

7

- 2.1. Priones y *prionoides* 7
- 2.2. Amiloides en *Metazoa* 8
  - A. PROTEINOPATÍAS AMILOIDES 8
    - 2.2.1. Neurodegenerativas 9
      - i. PrP 9
      - ii. Péptido A $\beta$  9
      - iii.  $\alpha$ -sinucleína 10
    - 2.2.2. Sistémicas 10
    - 2.2.3. Agentes causantes del daño y toxicidad celulares 11
  - B. AMILOIDES FUNCIONALES 12
- 2.3. Amiloides funcionales en microorganismos 12
  - 2.3.1. Bacterias: CsgA y biopelículas 12
  - 2.3.2. Hongos: priones en levaduras [*PSI*<sup>+</sup>] 13
- 2.4. Otros agregados parcialmente amiloides 16
  - 2.4.1. Agregados intracelulares bacterianos: cuerpos de inclusión 17
  - 2.4.2. Deposición de agregados proteicos en levaduras 18

### 3. Factores moduladores de la amiloidogénesis de proteínas

19

- 3.1. Chaperonas 19
  - 3.1.1. Chaperona DnaK 19
    - i. Mecanismo de acción de Hsp70 19
    - ii. Hsp104 y su acción conjunta con Hsp70 en la disgregación 20
  - 3.1.2. Prion [*PSI*<sup>+</sup>]: chaperonas Hsp70 y Hsp104 22
  - 3.1.3. Hsp70 y Hsp104 en proteinopatías amiloides 23
    - i. PoliQ 24
    - ii. Tau 24
    - iii.  $\alpha$ -sinucleína 24
    - iv. Péptido A $\beta$  25
  - 3.1.4. Transmisibilidad molecular 25
- 3.2. Ácidos nucleicos y otros cofactores polianiónicos 25

### 4. La proteína multifuncional RepA del plásmido pPS10

27

- 4.1. RepA en la replicación de pPS10 27
- 4.2. Amiloides RepA-WH1 28

## II. OBJETIVOS

33

<b>III. MATERIALES</b>	<b>37</b>
<b>1. Células bacterianas y de levaduras</b>	<b>39</b>
1.1. Bacterias	39
1.2. Levaduras	40
<b>2. Plásmidos</b>	<b>41</b>
2.1. Bacterias	41
2.2. Levaduras	42
<b>3. Medios de cultivo</b>	<b>44</b>
3.1. Bacterias	44
3.2. Levaduras	44
<b>4. Reactivos</b>	<b>45</b>
4.1. Enzimas	45
4.1.1. Enzimas de restricción	45
4.1.2. Polimerasas	45
4.1.3. ADN ligasa	45
4.1.4. Otras enzimas	45
4.2. Anticuerpos	45
4.3. Oligonucleótidos	46
4.4. Secuenciación de ADN	46
4.5. Purificación de fragmentos de ADN	46
4.6. Proteínas	46
4.7. Microscopía	46
4.8. Otros	46
<b>IV. MÉTODOS</b>	<b>47</b>
<b>MÉTODOS RELATIVOS A <i>E. coli</i>.</b>	<b>49</b>
<b>1. Manipulación del ADN</b>	<b>49</b>
1.1. Células competentes y transformación de <i>E. coli</i>	49
1.1.1. Choque térmico	49
1.1.2. Electroporación	49
1.2. Extracción de ADN	49
1.2.1. ADN plásmidico	49
1.2.2. ADN genómico	49
1.3. Construcción de vectores de expresión	50
1.3.1. Construcción de pWH1(A31V/WT)-mCherry -/+ ( <i>opsp</i> )18	51
1.3.2. Construcción de pRK2-WH1(A31V)-mCherry ( <i>opsps+lacI</i> )	52
1.3.3. p15A- <i>dnaK/clpB</i>	52
1.4. Inserción de genes en el cromosoma de <i>E. coli</i> , MG1655	52
1.4.1. Integración de los módulos de expresión WH1(A31V) y WH1( $\Delta$ N37)	52
1.4.2. Transducción de los genes YFP e lbpA-GFP	53
<b>2. Cultivos celulares bacterianos</b>	<b>54</b>
2.1. Observación de las bacterias al microscopio	55
A. INSTRUMENTACIÓN EMPLEADA	55

2.1.1. Microscopios de epifluorescencia	55
2.1.2. Microscopio confocal	55
2.1.3. Microscopía electrónica de transmisión	55
B. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU VISUALIZACIÓN	56
2.1.1. Microscopio de fluorescencia	56
i. Fijación y montaje de las células	56
ii. Tinción con BTA-1	56
iii. <i>Time-lapse</i> : Estudios con resolución temporal	56
2.1.2. Microscopía confocal: Inmunofluorescencia	56
2.1.3. Inmuno-microscopía electrónica de transmisión	57
2.2. Análisis bioquímico	58
2.2.1. Cuantificación de WH1(A31V), DnaK y ClpB mediante <i>Western blot</i>	58
2.2.2. Caracterización de los agregados: Electroforesis en geles de agarosa en condiciones semi-desnaturalizantes (SDD-AGE)	58
<b>3. Microchips y observación microfluídica</b>	<b>59</b>
3.1. Fabricación de <i>chips</i>	59
3.2. Condiciones de crecimiento de <i>E. coli</i> MG1655	59
3.3. Microscopía y microfluídica	60
<b>MÉTODOS RELATIVOS A <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>61</b>
<b>1. Manipulación del ADN</b>	<b>61</b>
1.1. Células competentes y transformación de <i>S. cerevisiae</i>	61
1.1.1. Preparación de células electrocompetentes	61
1.1.2. Electroporación de <i>S. cerevisiae</i>	61
1.2. Construcción de vectores	61
1.2.1. Sustitución de las repeticiones PrD en Sup35p por repeticiones del dominio amiloidogénico de RepA-WH1(A31V)	62
i. pUKC_R5	63
ii. pUKC_R5+WH1-R1	64
iii. pUKC_R5+WH1-R2	64
iv. pUCK_RO	64
v. pUKC_R0-WH1-R1, 2 y 3	64
vi. pUKC_R0-WH1-R4 y 5	64
1.2.2. Serie de vectores de expresión de proteínas en levaduras, pYeF2	65
1.2.3. Vectores de expresión del dominio quimérico NM_WH1-R-mCherry, pCM182	65
<b>2. Bioquímica de los agregados</b>	<b>65</b>
2.1. Expresión de proteínas bajo el promotor de galactosa	65
2.1.1. Lisado de células de <i>S. cerevisiae</i>	66
2.2. Caracterización de los agregados	66
2.2.1. Ensayo de sedimentación: fraccionamiento de extractos celulares	66
2.2.2. SDD-AGE de los extractos totales de células de levadura lisadas	66
<b>3. Caracterización del potencial de la secuencia WH1-R para la formación de priones funcionales</b>	<b>67</b>
3.1. Ensayo de mantenimiento de [PSI <sup>+</sup> ]	67

3.1.1. Fenotipo por color y crecimiento en medio deficiente en adenina (SD-Ade)	67
3.1.2. Ensayo de curación de [ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ]: efecto del cloruro de guanidina	68
3.2. Visualización de los agregados al microscopio de fluorescencia	68
3.2.1. Expresión de las quimeras de NM_WH1-R rojas fluorescentes por inducción con doxiciclina (TET-ON)	68
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>69</b>
<b>1. Efecto del amiloide WH1(A31V) en <i>E. coli</i> <i>in vivo</i></b>	<b>71</b>
1.1. Efecto del ADN en la agregación intracelular	71
1.2. Toxicidad de RepA-WH1(A31V)	73
1.2.1. Fenotipos en la transformación	73
i. Eficiencia de transformación	73
ii. Transposición del elemento móvil <i>IS10</i>	73
1.2.2. Proliferación celular	75
i. Efecto de los agregados en la división	75
ii. Transmisión vertical de las inclusiones: RepA-WH1 como <i>prionoide</i>	76
1.3. Características ultraestructurales y distribución intracelular de las inclusiones amiloides	78
<b>2. Factores involucrados en la amiloidosis de WH1(A31V): Chaperonas</b>	<b>80</b>
2.1. Amiloidogénesis en estirpes de <i>E. coli</i> deficientes en chaperonas ( <i>dnaK</i> <sup>ts</sup> / <i>clpB</i> )	80
2.1.1. Microscopía de fluorescencia	82
i. Expresión del <i>prionoide</i> RepA-WH1(A31V)	82
ii. Complementación con DnaK y ClpB	82
2.2. DnaK genera oligómeros transmisibles verticalmente	87
2.2.1. Microscopía confocal y electrónica de transmisión	87
2.2.2. Caracterización bioquímica de los agregados	90
<b>3. Aproximación a la dinámica de la amiloidogénesis a través de microfluídica</b>	<b>93</b>
3.1. Propagación del <i>prionoide</i> RepA-WH1	93
3.2. Cofactores involucrados en la amiloidosis de RepA-WH1	95
3.3. Naturaleza de los agregados RepA-WH1	95
<b>4. Propagación del prion Sup35_RepA-WH1p en <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>96</b>
4.1. Mantenimiento del prion [ <i>PSI</i> <sup>+</sup> ] en las quimeras Sup35_WH1-Rp [ <i>REP-PSI</i> <sup>+</sup> ]	96
4.1.1. Diseño y construcción	96
4.1.2. Las quimeras Sup35_WH1-Rp presentan pérdida de la función de terminación traduccional	99
4.2. Las fusiones Sup35_WH1p agregan <i>in vivo</i>	101
4.2.1. Ensayo de sedimentación	101
4.2.2. SDD-AGE	103
4.3. Papel de la chaperona Hsp104 en la propagación de quimeras [ <i>REP-PSI</i> <sup>+</sup> ]	103
4.3.1. Ensayo de inhibición de Hsp104 por guanidina	103
4.4. Expresión de Sup35_WH1(R)-mCherry en <i>S. cerevisiae</i>	106
4.4.1. La expresión de quimeras WH1(R)-Sup35(NM)p genera núcleos de agregación	106
4.4.2. Efecto de las chaperonas Ssa1p y Ssa2p	106

<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>111</b>
<b>1. El amiloide RepA-WH1(A31V) es un <i>prionoide</i> en <i>E. coli</i></b>	<b>113</b>
1.1. Caracterización de la naturaleza <i>prionoide</i> de RepA-WH1(A31V)	113
1.1.1. Amiloidogenicidad	113
1.1.2. Trasmisibilidad molecular	115
1.1.3. Transmisión vertical	115
1.2. Estirpes conformacionales de RepA-WH1(A31V) en los microcanales de flujo	116
1.2.1. Polimorfismo estructural	116
1.2.2. Interconversión entre estirpes	119
1.3. Toxicidad del <i>prionoide</i>	119
<b>2. Cofactores de la amiloidosis</b>	<b>120</b>
2.1. Inducción de la amiloidosis de RepA-WH1(A31V) por el ADN <i>in vivo</i>	120
2.2. Chaperonas DnaK y ClpB: su efecto sobre la transmisión de primordios amiloides	122
<b>3. RepA-WH1(A31V) determina la amiloidosis en un prion heterólogo <i>in vivo</i>: quimeras con [PSI<sup>+</sup>] en <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>124</b>
3.1. Repeticiones oligopeptídicas (OPR) mixtas (Q/N-hidrofóbicas) en la propagación de priones	125
3.1.1. Pérdida espontánea del prion quimérico Sup35p_WH1-R1 y R2	125
3.1.2. Estabilidad de las quimeras Sup35p_WH1-R3, R4 y R5	127
3.2. Cofactores de la amiloidosis en <i>S. cerevisiae</i> : chaperonas Hsp70 y Hsp104	127
3.2.1. Curación de las estirpes [REP-PSI <sup>+</sup> ] por guanidina: papel de la chaperona Hsp104	127
3.2.2. Posible función de Ssa1p y Ssa2p en la propagación de las quimeras en <i>S. cerevisiae</i>	128
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>131</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>135</b>
<b>IX. MATERIAL SUPLEMENTARIO-PELÍCULAS</b>	<b>149</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla 1.</b> Priones y prionoides potenciales en enfermedades y en la Naturaleza	8
<b>Tabla 2.</b> Estirpes de <i>E. coli</i> empleadas	40
<b>Tabla 3.</b> Estirpes de <i>S. cerevisiae</i> empleadas	41
<b>Tabla 4.</b> Plásmidos utilizados en este trabajo para los experimentos en <i>E.coli</i>	42
<b>Tabla 5.</b> Plásmidos utilizados en este trabajo en la sección sobre <i>S. cerevisiae</i>	44
<b>Tabla 6.</b> Oligonucleótidos empleados para clonar en los plásmidos de <i>E.coli</i>	51
<b>Tabla 7.</b> Oligonucleótidos empleados para clonar en los plásmidos de <i>S. cerevisiae</i>	62
-----	
<b>Figura 1.</b> Panorámica estructural de la agregación amiloide	4
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de la amiloidosis de proteínas	6
<b>Figura 3.</b> Esquema de la cinética característica de las amiloidosis <i>in vitro</i>	7
<b>Figura 4.</b> Bases moleculares de la propagación de [PSI <sup>+</sup> ] en <i>S. cerevisiae</i>	14
<b>Figura 5.</b> Esquema de la distribución asimétrica de las inclusiones de proteínas agregadas en <i>E. coli</i> y en <i>S. cerevisiae</i>	18
<b>Figura 6.</b> Detalle del mecanismo de disgregación del sistema bichaperona Hsp104-Hsp70	21
<b>Figura 7.</b> Modelo de acción de Hsp104	22
<b>Figura 8.</b> Esquema del replicón del plásmido pPS10	27
<b>Figura 9.</b> Caracterización de la naturaleza amiloide de RepA-WH1(A31V)	29
<b>Figura 10.</b> Modelo de los cambios conformacionales experimentados por WH1(A31V) en la amiloidogénesis	30
<b>Figura 11.</b> Esquema de la ruta propuesta para la amiloidosis de RepA-WH1(A31V)	31
<b>Figura 12.</b> Ilustración de la estrategia de integración de WH1(A31V/ΔN37), YFP e IbpA-GFP en el cromosoma de MG1655	54
<b>Figura 13.</b> Presentación de un <i>chip</i> microfluídico	60
<b>Figura 14.</b> Esquema de los vectores que expresan las versiones truncadas y quimeras SUP35_WH1(R)	63
<b>Figura 15.</b> Esquema del ensayo del mantenimiento de [PSI <sup>+</sup> ] por las versiones truncadas de Sup35p en la estirpe 74D-694	67
<b>Figura 16.</b> Rep-WH1(A31V) fusionada a mCherry se acumula como inclusiones amiloides en el citoplasma de <i>E. coli</i>	72
<b>Figura 17.</b> Efecto fenotípico de la transformación de pWH1(A31V)-mCherry en células de <i>E. coli</i> MC4100	74
<b>Figura 18.</b> El elemento genético móvil IS10	75
<b>Figura 19.</b> Dinámica <i>in vivo</i> de las inclusiones WH1(A31)-mCherry seguidas por microscopía <i>time-lapse</i>	76,77
<b>Figura 20.</b> Análisis ultra-estructural de las inclusiones en células de <i>E. coli</i> MC4100	79

<b>Figura 21.</b> Expresión del amiloide RepA-WH1(A31V)-mCherry en las estirpes de <i>E.coli</i> silvestre (MC4100), <i>dnaK756<sup>ts</sup></i> (JGT20) y <i>ΔclpB</i> (JGT3)	81
<b>Figura 22.</b> Expresión del amiloide RepA-WH1(A31V)-mCherry y las chaperonas en las estirpes deficientes para chaperonas (JGT20, JGT3)	83
<b>Figura 23.</b> Análisis cuantitativo de la expresión de WH1(A31V), DnaK y ClpB	85
<b>Figura 24.</b> Expresión de RepA-WH1(A31V) en la estirpe doble mutante JGT32 ( <i>dnaK756</i> y <i>ΔclpB</i> )	86
<b>Figura 25.</b> Gráficas de las cuantificaciones de células de <i>E. coli</i>	87
<b>Figura 26.</b> Distribución intracelular de RepA-WH1(A31V)-mCherry y DnaK/ClpB analizada a través de microscopía de epifluorescencia y confocal	89
<b>Figura 27.</b> Complejos entre RepA-WH1(A31V)-mCherry y DnaK/ClpB mostrados mediante iEM	90
<b>Figura 28.</b> Distribución de la fracción agregada y soluble de las proteínas RepA-WH1(A31V), DnaK y ClpB	91
<b>Figura 29.</b> Caracterización de los oligómeros RepA-WH1(A31V) en <i>E. coli</i> por SDD-AGE	92
<b>Figura 30.</b> Imágenes capturadas del crecimiento de <i>E. coli</i> MG1655 expresando RepA-WH1(A31V) en el dispositivo de canales microfluídicos	94
<b>Figura 31.</b> Reconstrucción de las repeticiones amiloidogénicas WH1-R en las proteínas quiméricas Sup35_RepA(WH1)p	98
<b>Figura 32.</b> Capacidad de las proteínas quiméricas Sup35_RepA(WH1)p de mantener el determinante [PSI <sup>+</sup> ]	100
<b>Figura 33.</b> Las quimeras Sup35_RepA(WH1)p producen agregados que se disponen en la fracción insoluble y son resistentes a detergentes <i>in vivo</i>	102
<b>Figura 34.</b> Fenotipo de ganancia de función de las quimeras Sup35_RepA(WH1) es independiente de la acción de Hsp104	105
<b>Figura 35.</b> La expresión de quimeras PrD-mCherry produce agregados citoplasmáticos	108
<b>Figura 36.</b> Posible naturaleza amiloide del complejo de <i>handcuffing</i>	114
<b>Figura 37.</b> Esquema de la dinámica de ensamblaje del prionoide WH1(A31V) en <i>E. coli</i>	118
<b>Figura 38.</b> Detalle estructural de la interacción de la chaperona Hsp70 con los iniciadores de la replicación Orc4p y RepE	123
<b>Figura 39.</b> Representación del ensayo de codones <i>stop</i> por supresión de Sup35_R0 y de Sup35_WH1-R en <i>S. cerevisiae</i>	126



## ABREVIATURAS

<b>3D</b>	Tridimensional
<b>AAA+</b>	ATPasa
<b>Ara</b>	Arabinosa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AGE</b>	Electroforesis en gel de agarosa
<b>APP</b>	Proteína precursora amiloide
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATPasa</b>	Actividad adenosin-trifosfatasa
<b>BTA1</b>	2-(4'-Metilaminofenil)benzotiazol
<b>CAA</b>	Casaminoácidos
<b>Cm</b>	Cloranfenicol
<b>CPEB</b>	Proteína de unión al elemento de poliadenilación
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DC</b>	Dicroísmo circular
<b>DIC</b>	Contraste interferométrico diferencial
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>5-FOA</b>	Ácido 5' fluoro-orótico
<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato
<b>HA</b>	Etiqueta de hemaglutinina
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>ILD</b>	Enfermedad pulmonar intersticial
<b>IRL</b>	Repetición invertida a la izquierda
<b>IRR</b>	Repetición invertida a la derecha
<b>ITC</b>	Calorimetría de titulación isotérmica
<b>IPOD</b>	Depósito de proteína insoluble
<b>IPTG</b>	Isopropil β-D-tiogalactósido
<b>Kpb</b>	Kilo pares de bases
<b>JUNQ</b>	Compartimento yuxtannuclear de control de calidad
<b>MCS</b>	Sitio de clonación múltiple
<b>MET</b>	Microscopio electrónico de transmisión
<b>NBD</b>	Dominio de unión al nucleótido
<b>NEF</b>	Factor intercambiador de nucleótido
<b>OPR</b>	Repeticiones oligopeptídicas
<b>ORC</b>	Complejo de reconocimiento del origen
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura
<b>PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida
<b>PCMA</b>	Amplificación cíclica del plegamiento incorrecto de proteínas
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDB</b>	Banco de datos de estructuras de proteínas
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PrP</b>	Proteína del prion
<b>RBS</b>	Sitio de unión a ribosomas
<b>RF</b>	Factor de liberación traduccional
<b>RGB</b>	Rojo-verde-azul
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>SBD</b>	Dominio de unión al sustrato
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TBE</b>	Tris/Borato/EDTA
<b>ThT</b>	Tioflavina-T

<b>Ts</b>	Termosensible
<b>TSE</b>	Encefalopatía espongiforme transmisible
<b>WH</b>	<i>Winged helix</i>
<b>WT</b>	Silvestre

---

## I. INTRODUCCIÓN

---

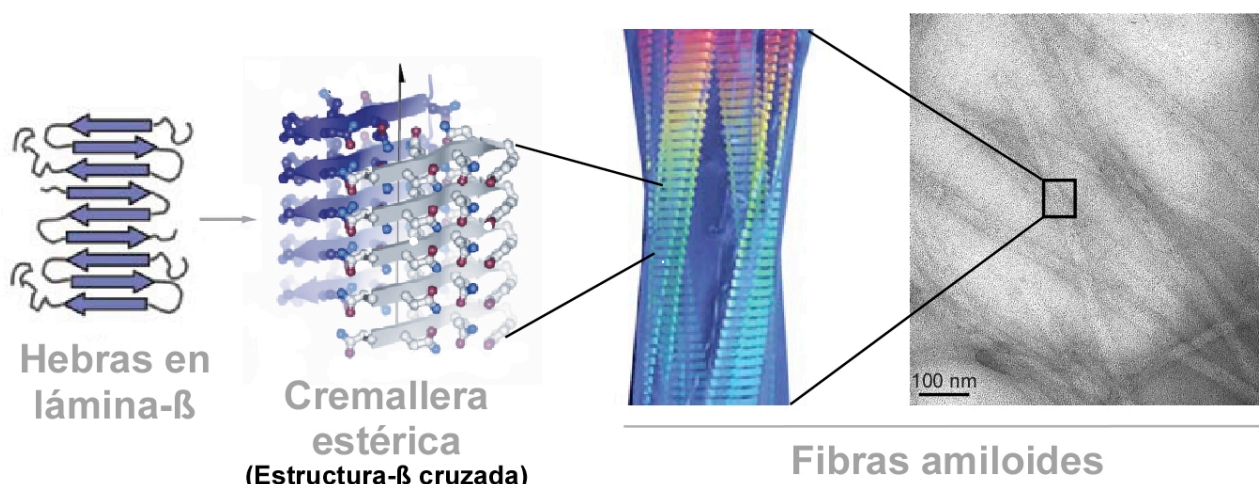
## 1. PROTEÍNAS AMILOIDES: BASES MOLECULARES Y ESTRUCTURALES

### 1.1. Estructura de los ensamblajes amiloides

El interés por los amiloides abarca la ciencia de proteínas, la biotecnología y, primordialmente, la biomedicina puesto que son los agentes causantes de proteinopatías clínicamente relevantes, bien sean sistémicas (amiloidosis relacionada con la diálisis) o neurodegenerativas (enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Creutzfeldt-Jakob y Huntington) (Chiti y Dobson, 2006; Tuite y Serio, 2010; Weissmann y col., 2011). Aunque las proteínas amiloides se asocian a muchas enfermedades, algunas de ellas amiloides desempeñan funciones biológicas beneficiosas.

Las proteínas amiloides tienen en común una estructura tridimensional (3D) extremadamente estable y sencilla, llamada lámina- $\beta$  cruzada. Copias múltiples de un segmento peptídico, cada una de ellas proveniente de diferentes moléculas de la misma proteína, se ensamblan como hebras- $\beta$  en una lámina- $\beta$  de extensión indefinida, que se yuxtaponen y se trenzan formando fibras (**Figura 1**) (Chiti y Dobson, 2006). Las hebras adyacentes (espaciadas por  $\sim 4.7$  Å) interactúan por puentes de hidrógeno, determinando los residuos implicados la disposición paralela o antiparalela de la lámina- $\beta$ . El empaquetamiento de láminas contiguas (espaciadas por  $\sim 9-11$  Å) sucede a través de la interdigitación de las cadenas laterales compatibles (hidrofóbicas o polares) dando así lugar a una “cremallera estérica” (Perutz y col., 1993; Nelson y col., 2005; Sawaya y col., 2007). El conjunto de estas interacciones genera la agregación ordenada en forma de fibras amiloides.

Las fibras crecen por reclutamiento de moléculas de proteína soluble nativa, gracias a que los ensamblajes amiloides son capaces de moldear en aquéllas su conformación de lámina- $\beta$  cruzada (Eichner y Radford, 2011a), lo que les confiere su transmisibilidad molecular (ver apartado **Introducción 3.1.4**). Esta propiedad es única entre los ensamblajes de proteínas. El estado agregado amiloide es, termodinámicamente, el más estable que puede adoptar una cadena polipeptídica (Baldwin y col., 2011). Puesto que se pueden encontrar condiciones conducentes a la agregación como amiloide de casi cualquier proteína, éste ha sido considerado un plegamiento ancestral (Chiti y Dobson, 2006). La Naturaleza utiliza el estado amiloide en muchos contextos estructurales, donde es necesario un material fuerte pero flexible (Knowles y Buehler, 2011). Así los amiloides funcionales se encuentran en metazoos, hongos y bacterias, a los que la herencia de estas estructuras les puede resultar ventajosa, ya que pueden generar nuevas funciones en la célula y permitir una adaptación rápida ante las variaciones medioambientales.



**Figura 1.** Panorámica estructural de la agregación amiloide. Las hebras-β (flechas azules) interactúan a través de puentes de hidrógeno formando una lámina-β. El ensamblaje a su vez de varias de esas láminas-β, mediante la interacción de sus cadenas laterales formando una cremallera estérica, genera una estructura de lámina β-cruzada (protofibras) que se asocian lateralmente como fibras. Éstas son visibles tras tinción negativa, mediante microscopía electrónica de transmisión.

## 1.2. Potencial amiloidogénico y polimórfico

Las proteínas amiloides que agregan *in vivo* pueden formar fibras *in vitro*, los cuales poseen propiedades morfológicas, estructurales y de tinción características (Stefani y Dobson, 2003; Uversky y Fink, 2004). Aunque la formación de agregados de proteínas es un fenómeno común, diversas metodologías biofísicas permiten caracterizarlos o no como amiloides. Éstos poseen un patrón de difracción de rayos X (anillos o lunetas de reflexión a 4.7 y 10 Å), consistente con una arquitectura fibrilar en lámina-β cruzada (Chien y col., 2004). Las fibras amiloides se pueden visualizar además al ME (**Figura 1**), y tienen afinidad por colorantes y fluoróforos hidrofóbicos como el rojo Congo y la tioflavina T, con los que se puede monitorizar la cinética de formación de amiloides *in vitro* (Eichner y Radford, 2011a).

### 1.2.1. Predicción de secuencias amiloides

La existencia de secuencias concretas en una proteína con tendencia a agregar ha permitido desarrollar algoritmos (TANGO, WALTZ, 3D profile) (Goldschmidt y col., 2010; Maurer-Stroh y col., 2010) que predicen el potencial de agregación de proteínas y de proteomas enteros. Tales algoritmos son capaces de identificar regiones amiloidogénicas, compuestas por un mínimo de 6 residuos (Goldschmidt y col., 2010; Maurer-Stroh y col., 2010), que suelen encontrarse ocultas en el interior de la estructura 3D (Goldschmidt y col., 2010). Algoritmos como WALTZ permiten además discriminar entre agregación amorfa y β-amiloide, exhibiendo esta última una dependencia del entorno en el que se encuentra la secuencia. De hecho, se puede distinguir entre amiloides funcionales y los asociados a enfermedades, ya que los primeros presentan residuos de mayor polaridad (Maurer-Stroh y col., 2010).

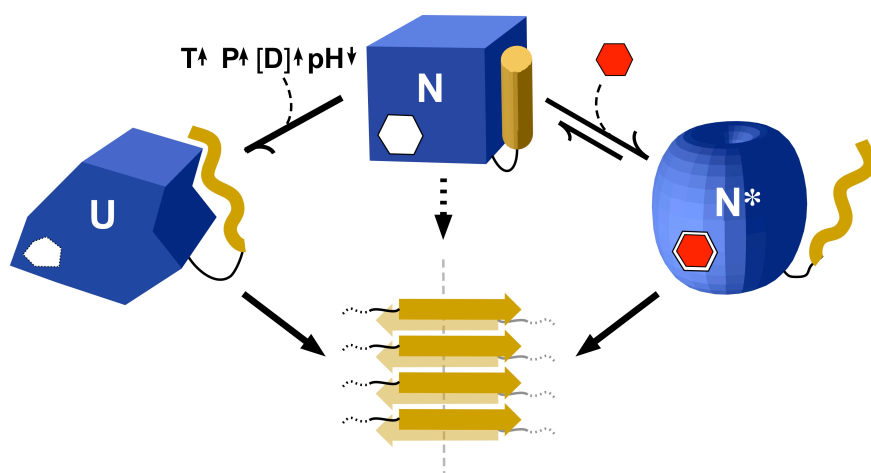
### 1.2.2. Polimorfismo estructural de los amiloides

El estado amiloide posee variabilidad intrínseca, es decir que diferentes pero cercanas trayectorias conformacionales pueden canalizar la energía libre asociada al plegamiento y al ensamblaje. Dicha variabilidad está mediada por las condiciones físico-químicas o por eventos estocásticos que afectan a las fases de nucleación y/o de elongación de la amiloidogénesis, lo que da lugar a diferentes variantes amiloides de una misma proteína. De hecho, las fibras amiloides exhiben un amplio grado de polimorfismo estructural, en particular las formadas por proteínas que portan repeticiones amiloidogénicas imperfectas en tándem de una secuencia consenso dada (Pawar y col., 2005). Las repeticiones heterogéneas generan versatilidad en las cremalleras estéricas y dan lugar a múltiples ensamblajes alternativos, cada uno de los cuáles representa una estirpe conformacional del estado amiloide (Wiltzius y col., 2009).

### 1.3. Transformación del estado nativo al estado amiloide: cinética

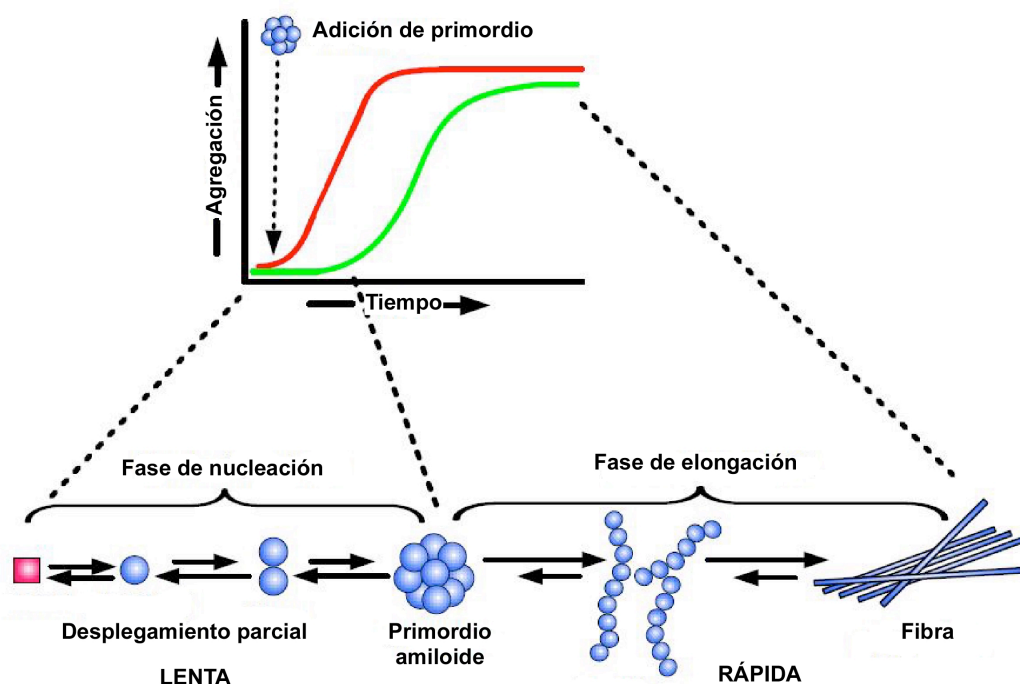
El ensamblaje amiloide se puede producir tanto en proteínas nativas desplegadas (Turoverov y col., 2010) como en globulares (Chiti y Dobson, 2009). En este último caso, es común que sea requerido un desplegamiento parcial con el fin de exponer regiones potenciales amiloidogénicas, de otro modo inaccesibles al solvente, por estar protegidas en la proteína en forma de hélices- $\alpha$  o enterradas en el núcleo de la proteína plegada (Giraldo, 2010). En muchas proteínas, esta acción se consigue mediante cambios en las condiciones físico-químicas de los ensayos, como bajo pH, altas temperaturas o presión, o soluciones concentradas de agentes desnaturalizantes o caotrópicos (como urea o guanidina) (**Figura 2**). Sin embargo, estas aproximaciones tienen aplicabilidad limitada cuando se trata de mimetizar la amiloidosis *in vivo*. Esta se puede conseguir mediante mutaciones puntuales o modificaciones post-traduccionales, como la proteólisis.

Los ligandos alostéricos proveen una vía específica capaz de modular la estructura proteica, por lo general con alta afinidad y amplio rango dinámico (Laskowski y col., 2009). La unión alostérica puede alterar el equilibrio conformacional de las proteínas a través de varios niveles de organización: disociación de las subunidades en un oligómero, alteraciones locales en la estructura terciaria o mediando una transformación entre estructuras secundarias (por ejemplo despliegue de una región  $\alpha$ -helicoidal a una estructura desordenada, que actúa como precursor amiloide). La unión de un ligando puede generar un conjunto de intermediarios conformacionales metaestables de la proteína ( $N^*$ ) (**Figura 2**), algunos de los cuales serán capaces actuar como núcleos de amiloidogénesis (Giraldo, 2007).



**Figura 2.** Mecanismos de la amiloidosis de proteínas. Ésta puede ocurrir espontáneamente, a partir de una proteína plegada nativa (N) (flecha discontinua). En cambio, es más común que tras un desplegamiento parcial de la proteína (U), regiones peptídicas (dibujadas en amarillo) que normalmente se encuentran en una conformación no  $\beta$ , como hélice- $\alpha$  o *coil*, se ensamblen irreversiblemente como hebras- $\beta$  (flecha) formando una lámina- $\beta$  cruzada amiloide (abajo). El desplegamiento parcial puede suceder bajo condiciones fisico-químicas extremas (izquierda), como altas temperaturas (T), elevada presión hidrostática (P), altas concentraciones de agentes desnaturalizantes (D) o pH ácido. Alternativamente, la unión alósterica de una molécula ligando (rojo) en una región de la proteína puede resultar en un cambio conformacional (equilibrio desplazado) hacia una conformación metaestable con tendencia a agregar (N\*), donde la región amiloidogénica queda accesible para auto-ensamblarse (derecha). Imagen tomada de Giraldo (2010).

Modelos basados en medidas experimentales (en su mayoría espectroscópicas) indican que el ensamblaje amiloide en proteínas se ajusta a una cinética de curva sigmoideal, característica de la polimerización nucleada (Frieden, 2007; Andersen y col., 2009). Ésta consta de en una fase inicial lenta de nucleación (*lag*, fase de latencia), en la que sucede una conversión conformacional de la proteína nativa que conlleva la formación de pequeños primordios oligoméricos. Esta fase está seguida por otra exponencial de elongación que es rápida, en la que sucesivos bloques oligoméricos se añaden a los agregados (**Figura 3**). La rapidez (pendiente de la curva) de esta última es función de la habilidad de los núcleos preexistentes para servir como moldes, y de dirigir la deposición de moléculas de proteína solubles en los extremos crecientes de las fibras. La ruptura de las fibras amiloides, por cizalla *in vitro*, o por la acción de proteínas de la familia de chaperonas *in vivo*, crea nuevos oligómeros que actúan como primordios. Estos son capaces de nuclear las siguientes amplificaciones amiloidogénicas y reducir así la duración de la fase de nucleación (**Figura 3**).



**Figura 3.** Esquema de la cinética característica de las amiloidosis *in vitro*. Está dividida en dos fases: i) fase de nucleación, donde se forman los primordios oligoméricos por un proceso lento que implica el desplegamiento parcial de la proteína nativa e interacciones intermoleculares desfavorables; y ii) una fase de elongación, etapa que es mucho más rápida y que da lugar a las fibras por unión de los primordios. La fase limitante del proceso es la formación de éstos, pues una vez generados promueven rápidamente la agregación. La formación del amiloide se puede acelerar gracias a la adición de partículas preformadas (curva roja), análogas a las estructuras transmisibles. Figura adaptada de Soto y col. (2006).

## 2. BIOLOGÍA DEL ESTADO AMILOIDE

### 2.1. Priones y *prionoides*

Las variaciones conformacionales de las proteínas han adquirido protagonismo frente a las modificaciones post-traduccionales clásicas (glicosilación, fosforilación) para explicar algunos cambios en el fenotipo de células y organismos. En este ámbito, el ensamblaje amiloide desempeña un papel importante, ya que genera nuevos fenotipos por alteración de la función normal de las proteínas, por repuesta celular a la nueva conformación y/o por la propia acumulación de la forma amiloide. Los amiloides además de poseer una estructura 3D estable y ordenada, poseen la capacidad de autoensamblarse, son heredados (verticalmente) en la división celular y pueden transferirse (horizontalmente) entre las células u organismos, comportándose en este último caso como agentes infecciosos. A tales partículas proteicas infecciosas se les llama priones, término acuñado por Prusiner (Bolton y col., 1982), cuando aisló la forma infecciosa de la proteína PrP, responsable de las encefalopatías espongiformes transmisibles. Posteriormente, se han identificado proteínas de naturaleza priónica en otros organismos (Tuite y Serio, 2010).

Existe un grupo de proteínas en diversos organismos que pueden, como los priones, auto-replicar el cambio conformacional amiloide dando lugar igualmente a depósitos *in vivo*, pero que



carecen de infectividad. A dichas proteínas se les llama *prionoides*. Son capaces de promover el ensamblaje amiloide de moléculas solubles de la misma proteína *in vitro* e infectar a células de su progenie (transmisión vertical), pero no son infecciosas (Aguzzi, 2009). Ya que priones y prionoides no contienen información genética codificada en forma de ácidos nucleicos, ésta se encuentra implícita en la estructura amiloide agregada, que difiere de la del precursor monomérico soluble de la proteína (Aguzzi y Rajendran, 2009). Tanto los priones como los prionoides se ajustan a la hipótesis priónica original (“sólo proteína”), según la cual la partícula propagada es de naturaleza exclusivamente proteica (Prusiner, 1982).

## 2.2. Amiloides en Metazoa

### A. PROTEINOPATÍAS AMILOIDES

Un amplio número de enfermedades humanas provienen del fracaso por parte de un péptido o de una proteína al adoptar su conformación nativa funcional (**Tabla 1**). El impedimento del plegamiento correcto de una proteína provoca una reducción de la cantidad de la misma disponible para desempeñar su función normal (Chiti y Dobson, 2006), pero la patología, en la mayoría de estas enfermedades, se asocia con su conversión en agregados amiloides. Dichos agregados pueden presentar la morfología de inclusiones, placas o fibras y localizarse en el interior o exterior de las células. A continuación se presentan las proteinopatías con mayor incidencia, especificando su localización y la naturaleza del polipéptido implicado.

Fenotipo/Función	Proteína	Transmisibilidad molecular	Infeccioso
Enfermedad priónica	PrP	Sí	Sí
Enfermedad de Alzheimer	A $\beta$	Sí	Ratones que sobreexpresan APP
Taupatías	Tau	Posible	No demostrado
Enfermedad de Parkinson	$\alpha$ -sinucleína	Huésped a injerto	No demostrado
Enfermedad de Huntington	PoliQ	Sí	No demostrado
Supresor de terminación traduccional	Sup35	Sí	Limitado
Producción de biopelículas	Curli bacteriano	Sí	No demostrado
Incompatibilidad en heterocariontes (Hongos)	Het-s	Sí	No demostrado
Gránulos de secreción pituitarios	Hormona peptídica	No demostrada	No demostrado
Pigmentación de la piel en mamíferos	PmeI17	No demostrada	No demostrado

**Tabla 1.** Priones y prionoides potenciales en enfermedades y en la Naturaleza (separados por línea horizontal). Proteínas involucradas en enfermedades en mamíferos y en fenotipos beneficiosos en hongos y bacterias pueden, al igual que la proteína PrP, experimentar auto-ensamblaje como amiloides. Sin embargo, ninguno de esos prionoides puede comportarse como un agente infeccioso típico. Tabla adaptada de Aguzzi (2009).

## 2.2.1. Neurodegenerativas

### i. PrP

La acumulación de esta proteína es la causante de las TSE, que incluyen las enfermedades de Creutzfeldt-Jakob, de gerstmann-straussler-scheinker, el insomnio familiar fatal y el kurú en humanos, la encefalopatía espongiforme bovina (BSE) y el prurigo lumbar en ganado ovino (*scarpie*). Todas ellas se denominan también enfermedades priónicas (Stohr y col., 2008). Su clave molecular consiste en el cambio conformacional de la proteína priónica del huésped, denominada PrP<sup>C</sup>, a una isoforma infectiva PrP<sup>Sc</sup> (Prusiner, 1982; Prusiner, 1998). PrP<sup>C</sup> tiene un dominio N-terminal desordenado y otro C-terminal globular, formado por tres hélices- $\alpha$ , dos pequeñas láminas- $\beta$  antiparalelas y un puente disulfuro (entre la segunda y tercera hélice). A través de un anclaje glicoproteico, el dominio C-terminal se inserta en la membrana externa de neuronas y otras células (Harris, 1999). PrP tiene un papel pleiotrópico *in vivo*, habiéndose propuesto su participación en la homeostasis del Cu<sup>2+</sup> y, de manera tentativa, en la modulación de la sinapsis y en la adhesión celular (Cobb y Surewicz, 2009). La transición de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup> puede darse, con baja frecuencia, *in vivo* de manera espontánea, por infección con partículas preformadas o por mutación del gen que codifica para PrP (*PRNP*). Esa conversión provoca modificaciones importantes en las propiedades biofísicas de PrP<sup>C</sup>, que pasa de ser soluble, rica en estructura secundaria  $\alpha$ -helicoidal y no infecciosa a, agregar, incrementar su contenido en lámina- $\beta$  y ser infecciosa (PrP<sup>Sc</sup>) (Stohr y col., 2008).

Entre las mutaciones en PrP que provocan la herencia dominante de la enfermedad, se encuentra la expansión de un octapéptido N-terminal de alto contenido en residuos de prolina y glicina (PHGGGWGQ). Cinco repeticiones de esta secuencia componen el dominio OPR (dominio de repeticiones oligopeptídicas). Las versiones mutantes de *PRNP* pueden llegar a incluir de 2 a 9 repeticiones extra en el dominio OPR (Kovacs y col., 2002; Wadsworth y col., 2003). Además esas secuencias repetidas presentan analogías con las repeticiones de priones de levaduras, lo que sugiere que pueden ser importantes para la propagación del prion (Tuite y col., 2010).

### ii. Péptido A $\beta$

En la enfermedad de Alzheimer están implicadas dos proteínas, el péptido A $\beta$  y la proteína tau. El primero se acumula en placas amiloides, mientras que la proteína tau lo hace como fibras en el interior de las neuronas (Treusch y col., 2009). La elevación en los niveles fisiológicos del péptido A $\beta$ , mutaciones en su precursor (APP) o en los genes de las secretasas  $\beta$  y  $\gamma$  (que proteolizan APP y generan el péptido A $\beta$ ), dan lugar al comienzo de la enfermedad. La tendencia a agregar del péptido A $\beta$  *in vitro*, sugiere que la formación de fibras por A $\beta$  es la primera responsable de la manifestación neuropatológica de la enfermedad, aunque estudios recientes

demuestran que pequeños oligómeros, tras unirse a la membrana, son los causantes de la toxicidad de A $\beta$  (Cohen y col., 2006).

### iii. $\alpha$ -sinucleína

La agregación de esta proteína provoca las alteraciones neuropatológicas de la enfermedad de Parkinson. La  $\alpha$ -sinucleína pertenece a la familia de proteínas intrínsecamente desplegadas y posee en su dominio N-terminal diversas repeticiones degeneradas de un péptido que, a través de interacciones  $\alpha$ -helicoidales, median la inserción de la proteína entre los fosfolípidos de las membranas (Irvine y col., 2008). El dominio central de la  $\alpha$ -sinucleína está compuesto por residuos hidrofóbicos que están implicados en la formación de fibras amiloides (Singleton y col., 2003), mientras que el dominio C-terminal se asocia con una función de chaperona, involucrado en solubilizar complejos de alto peso molecular (Park y col., 2002).

La  $\alpha$ -sinucleína se acumula en inclusiones citoplasmáticas en las neuronas y es el mayor componente de los agregados proteicos denominados cuerpos de Lewis. Esta proteína es un prionoide al actuar de manera similar a los priones: un tejido sano, injertado en el cerebro de un enfermo de Parkinson, adquiere con el tiempo los cuerpos de Lewis (Li y col., 2008) pues la  $\alpha$ -sinucleína, tras liberarse de las neuronas, es capaz de infectar a las células vecinas, propagando así el estado amiloide. Esta infección supone la existencia de un mecanismo de transporte entre células (Angot y Brudin, 2009) y la transmisibilidad de la estructura de lámina- $\beta$  a moléculas solubles de  $\alpha$ -sinucleína (Aguzzi y Rajendran, 2009).

### 2.2.2. Sistémicas

La acumulación de la cadena ligera de la  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m) en el suero de los pacientes que sufren disfunción renal es 60 veces mayor que en personas sanas. Esta situación promueve que se deposite en forma de fibras amiloides en los tejidos osteoarticulares, dando lugar a la destrucción del hueso y a lo que se conoce como amiloidosis relacionada con diálisis (DRA) (Eichner y Radford, 2011b). Muchos factores parecen incrementar la agregación *in vitro* de la  $\beta$ 2m y pueden estar implicados en su amiloidosis *in vivo*: el Cu<sup>2+</sup>, glicosaminoglicanos, ácidos grasos no esterificados y colágeno. Éstos provocan que las secuencias con tendencia a agregar de la proteína queden expuestas, cuando normalmente se encuentran enterradas en la estructura nativa (Eichner y Radford, 2011b).

La proteína SOD1 (superóxido dismutasa 1) normalmente está estructurada globularmente, pero mutaciones en los genes *SOD1* causan la herencia dominante de la esclerosis lateral amiotrófica familiar (ALSf). La toxicidad de la patología está asociada con la tendencia de la proteína a desplegarse y formar inclusiones en las neuronas afectadas. Ésta puede difundirse a

áreas próximas, debido a su secreción al medio extracelular aunque mayoritariamente se encuentre en el citosol (Munch y col., 2011).

La enfermedad de Huntington, está provocada por la presencia de agregados en el tejido cerebral formados por versiones truncadas de la proteína huntingtina (Reddy y Housman, 1997) que posee expansiones de secuencias ricas en poliglutaminas (25, 47, 72 ó 123) en su dominio N-terminal (Krobitsch y Lindquist, 2000).

Por último, cabe destacar el descubrimiento reciente de que el dominio BRICHOS de la preproteína del surfactante pulmonar C (proSP-C) se requiere para la inserción de éste en la membrana. Dicho dominio tiene actividad de chaperona, y mutaciones en él o en su péptido de unión provocan depósitos amiloides del SP-C maduro en tejidos de pulmón en pacientes con ILD (enfermedad pulmonar intersticial). Mutaciones en el dominio BRICHOS que afectan a la actividad de proSP-C causan amiloidosis y su no funcionalidad como chaperona (Willander y col., 2012).

### **2.2.3. Agentes causantes del daño y toxicidad celulares**

La presencia de depósitos proteicos altamente ordenados (fibras) puede hacer pensar que éstos son los agentes causantes directos de las proteinopatías amiloides. En cambio, los precursores de las fibras amiloides, como los oligómeros de bajo peso molecular o protofibras estructuradas, son las especies moleculares que parecen resultar más ser tóxicas para la célula, mientras que las fibras maduras parecen ser inertes (Chiti y Dobson, 2006). Se ha descubierto que la forma más infectiva de la proteína del prion en mamíferos es un oligómero compuesto por unas 20 moléculas (Silveira y col., 2005).

La toxicidad de los agregados prefibrilares se debe a que las moléculas de proteína, al encontrarse parcialmente desplegadas, exponen residuos que normalmente se encuentran enterrados en su núcleo hidrofóbico. Los agregados pequeños tienen mayor proporción de residuos expuestos en sus superficies que los grandes, por lo que en el entorno celular pueden dirigir eventos aberrantes: interacciones inapropiadas, con metabolitos, con proteínas u otras macromoléculas o inserción en las membranas (Chiti y Dobson, 2006). Esto da lugar a un mal funcionamiento de las maquinarias celulares, afectando al transporte axonal o al balance de iones, provoca el secuestro de proteínas esenciales, o genera estrés oxidativo (Olzscha y col., 2011). Determinadas mutaciones pueden potenciar esta situación, de modo que los mecanismos de “control de calidad” de las proteínas, que normalmente remodelan y/o proteolizan a las que están mal plegadas, quedan abolidos y sucede la agregación. Además puede existir una predisposición familiar (genética), o la ingesta de agregados preformados, que actúan eficazmente como moldes, o un declive de los niveles o actividad de chaperonas y/o proteosomas (Dobson, 1999; Soti y col., 2005).

Se ha sugerido que los oligómeros amiloides interaccionan con las membranas celulares, generando poros (A $\beta$ ), provocando así la fuga de iones y de pequeñas moléculas y, por otro lado ( $\alpha$ -sinucleína y la huntingtina), la entrada de toxinas al citosol. Además la asociación y el anclaje de los péptidos amiloides a la membrana celular puede dirigir su oligomerización y la formación de poros directamente sobre ella (Aguzzi y Rajendran, 2009).

## B. AMILOIDES FUNCIONALES

Por otro lado, las especies fibrilares de naturaleza amiloide pueden desempeñar funciones en las células, siendo fascinante su habilidad para comportarse como elementos epigenéticos alternativos al ADN. Los amiloides funcionales constituyen entonces ejemplos de un tercer tipo de determinante epigenético, además de la metilación del ADN y la heterocromatización de regiones del genoma, basado en la agregación de proteínas que son heredadas siguiendo una segregación no mendeliana (Halfman y Lindquist, 2010).

Los amiloides desempeñan papeles en procesos biológicos naturales en diversos organismos (**Tabla 1**), como por ejemplo la adhesión celular o la pigmentación de la piel. El fragmento proteolítico de la glicoproteína de membrana Pmel17, es requerido para la maduración del melanosoma y estimula la síntesis de la melanina (Fowler y col., 2006). También, el almacenaje de hormonas peptídicas se puede realizar mediante estructuras amiloides que se depositan en los gránulos de secreción pituitarios (Maji y col., 2009). Un caso particular de amiloide funcional es la isoforma neuronal CPEB (proteína de unión al elemento de poliadenilación citoplasmática), que está implicada en el almacenamiento de la memoria en el molusco *Aplysia*. CPEB se ensambla como amiloide en las neuronas postsinápticas, formándose grandes complejos de proteína CPEB/ARN (Si y col., 2010). Además, la proteína CPEB tiene en su extremo N-terminal un dominio repetitivo de alto contenido en glutaminas, semejante al de la huntingtina, al del prion PrP o a los priones de levaduras (Heinrich y Lindquist, 2011).

## 2.3. Amiloides funcionales en microorganismos

### 2.3.1. Bacterias: CsgA y biopelículas

En bacterias se conocen muchos ejemplos de amiloides funcionales, aunque todos son ensamblados en el medio extracelular. Las fibras proteicas formadas a partir de la proteína curlina, son utilizadas por *E. coli*, *Salmonella thyphimurium* y otras enterobacterias para colonizar nuevos medios, ya que permiten la adhesión a superficies y sustentan la formación de biopelículas (Chiti y Dobson, 2006). Al igual que otras estructuras amiloides, las fibras de curlina (denominadas *curli*) poseen alto contenido de estructura lámina- $\beta$  (Chapman y col., 2002). Al menos seis proteínas codificadas en un operón (*csgBA* y *csgDEFG*) componen *curli* en *E. coli*. Operones homólogos se han encontrado en *Salmonella* (*agfBA* y *agfDEFG*) (Collinson y col., 1996), las fibras de las

proteínas codificadas por estos operones en *S. typhimurium* se denominan *tafi* (*thin aggregative fimbriae*). CsgA y CsgB pueden no expresarse en la misma célula, pues el ensamblaje de *curli* sucede en el medio extracelular: mediante un proceso de complementación, CsgA puede formar *curli* en la superficie de otra bacteria de *E. coli* que sólo exprese CsgB. Por otro lado, el operón *csgDEFG* codifica para cuatro proteínas accesorias que son necesarias para el ensamblaje del *curli* (Hammar y col., 1995). La regulación de su expresión génica es extraordinariamente compleja y es sensible a muchas señales ambientales (Gerstel y Romling, 2003). Se ha descrito que RpoS, el factor sigma de la fase estacionaria, juega un papel en la expresión génica de los mismos (Arnqvist y col., 1994). Un segundo ejemplo se encuentra en la bacteria filamentosa *Streptomyces coelicolor*, que produce una hifa aérea con superficie hidrofóbica amiloide, permitiendo la dispersión eficaz de las esporas. Las proteínas secretadas que forman ese ensamblaje amiloide son las chaplinas y también forman fibras *in vitro* (Epstein y Chapman, 2008).

La bacteria *Klebsiella pneumoniae* produce la proteína microcina E492 (bacteriocina). Ésta es un péptido pequeño citotóxico que tiene propiedades amiloides (Arranz y col., 2012) y que es capaz de matar a las enterobacterias, ya que forma poros en sus membranas citoplasmáticas (Destoumieux-Garzon y col., 2003). La microcina E492 tiene su máximo de actividad en la fase exponencial y, aunque su síntesis no se interrumpe, desaparece en la fase estacionaria ya que se ensambla en fibras amiloides (Raffen y col., 1999). En el caso de las harpinas, éstas son proteínas secretadas por bacterias fitopatógenas y se ensamblan formando amiloides que desestabilizan la membranas e inducen la muerte celular de la planta (Oh y col., 2007).

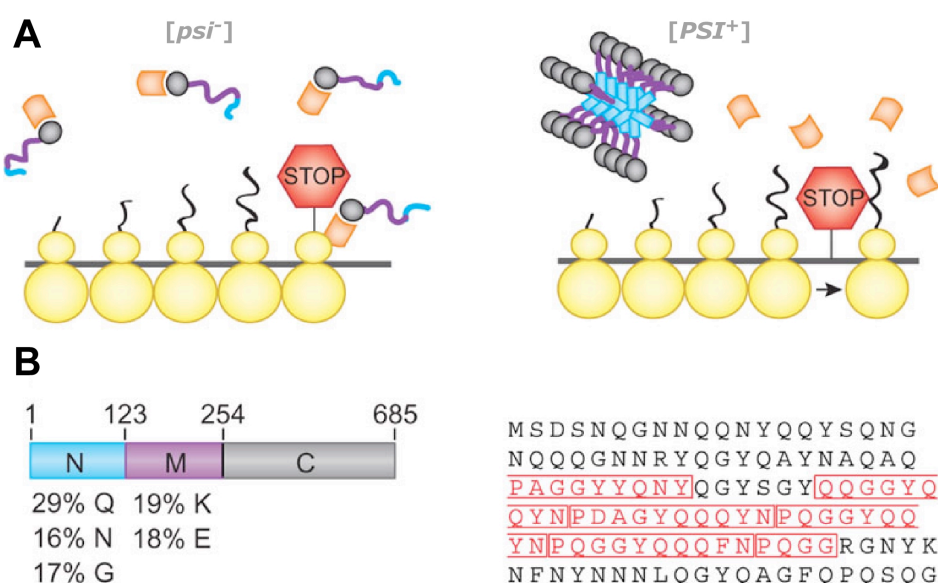
Por último, cabe destacar que hasta la fecha no se han encontrado priones citoplasmáticos en bacterias. Sin embargo, *E. coli* puede permitir la replicación en su interior del prion [*PSI<sup>+</sup>*] de levaduras (Garrity y col., 2010).

### 2.3.2. Hongos: priones en levaduras [*PSI<sup>+</sup>*]

Existen decenas de priones en levaduras que han sido conservados a través de la evolución (Alberti y col., 2009). Éstos confieren cierta ventaja selectiva ante determinadas condiciones fisiológicas y no son deletéreos para la célula (Chien y col., 2004; Shorter y Lindquist, 2005; Wickner y col., 2007). Debido a la transmisión por contacto del cambio conformacional, a su auto-ensamblaje y posterior fragmentación en propagones, las proteínas priónicas son elementos heredables de célula madre a hija y pueden producir fenotipos nuevos y estables. Los priones de hongos más estudiados han sido los formados por las proteínas Sup35p y Ure2p, Rnq1p en *Saccharomyces cerevisiae* y HET en *Podospora anserina*.

La proteína Sup35p está involucrada en el reconocimiento de codones *stop* durante la traducción de los ARNm. Sup35p es el factor de terminación traduccional (eRF3) que actúa

uniéndose al eRF1 (Sup45p) (**Figura 4**). La conversión del estado soluble de Sup35p [*psi*<sup>-</sup>] al estado agregado priónico [*PSI*<sup>+</sup>] causa la reducción de la actividad de terminación (Wickner y col., 1995; Patino y col., 1996) y la lectura corrida de los codones *stop*, de modo que los agregados pueden generar fenotipos beneficiosos en algunas ocasiones (Eaglestone y col., 1999; True y col., 2004). Otro prion es el formado por Ure2p, un inhibidor de Gln3 que es un factor transcripcional que reprime a los genes involucrados en metabolizar fuentes pobres de nitrógeno cuando fuentes más eficientes están presentes en el medio (Lian y col., 2006). Cuando Ure2 cambia de su estado soluble no priónico [*ure-o*] a su estado agregado [*URE3*<sup>+</sup>], la actividad de Ure2 está impedida y provoca la expresión génica (Wickner, 1994). Con respecto a Rnq1p no se conoce su función exacta, pero influye sobre otras proteínas priónicas, como por ejemplo Sup35p, para que alcancen el estado priónico (Derkatch y col., 1996; Wickner y col., 2001). Esta actividad se manifiesta cuando Rnq1p se encuentra en su forma agregada [*RNQ*<sup>+</sup>], que, junto a otros priones (como el formado por New1p), determinan el factor inducible llamado PIN. PIN promueve la formación del prion [*PSI*<sup>+</sup>]. Estas tres proteínas tienen en común la composición aminoácidica de la región que determina el carácter priónico: Sup35p y Ure2p presentan un alto porcentaje de residuos de glutamina y asparagina, al igual que Rnq1p, pero distribuidos a lo largo de toda su secuencia (Ross y col., 2005b).



**Figura 4.** Bases moleculares de la propagación de [*PSI*<sup>+</sup>] en *S. cerevisiae*. (A) El determinante proteico del prion [*PSI*<sup>+</sup>] es la proteína Sup35p. Cuando ésta se encuentra en estado soluble, es activa y se une a Sup45p (naranja) en las células [*psi*<sup>-</sup>] (izquierda), mientras que en las células [*PSI*<sup>+</sup>], se encuentra insoluble en forma de agregados de alto peso molecular y es inactiva (derecha). La inactivación de Sup35p causa la lectura corrida de los codones *stop* y provoca cambios fenotípicos. (B) Se representa un esquema de los dominios de Sup35p (izquierda) junto con la secuencia primaria del dominio N, con las 5.5 repeticiones oligopeptídicas (OPR) recuadradas en rojo (derecha). Imagen tomada de Tessier y Lindquist (2009).

La proteína HETs está implicada en la incompatibilidad heterocarionte de *P. anserina* (Coustou y col., 1999): para prevenir la fusión de estirpes de hongos con diferentes genomas, el

cambio del estado soluble no priónico [*het-s*] a su estado priónico [*Het-s*] facilita la muerte programada de ciertas fusiones incompatibles. Esta proteína también posee una región formadora de prion en su dominio C-terminal, pero no es rica en los aminoácidos característicos de los priones en levaduras (Ross y col., 2005b).

Otros priones se han descubierto recientemente en *S. cerevisiae*, como por ejemplo [*SWI<sup>+</sup>*], [*MOT3*], [*MCA*], [*OCT<sup>+</sup>*], y también nuevos fenotipos con herencia no mendeliana en *Schizosaccharomyces pombe* y *P. anserina* que pueden estar basados en estados priónicos. Muchos de ellos han sido identificados mediante análisis de secuencia del genoma en levaduras y otros organismos (Alberti y col., 2009), sacando partido de la particularidad de las secuencias ricas en Q y N, característica de los priones de levaduras. No obstante, podría haber otros priones que, al igual que HETs, no posean tales secuencias, por lo que no han podido ser identificados hasta ahora.

Sup35p/[*PSI<sup>+</sup>*] ha sido el más estudiado de los priones de levadura y ha aportado información sobre las bases moleculares de la conformación amiloide, el polimorfismo estructural y la transmisibilidad (Tessier y Lindquist, 2000). Su composición aminoacídica inusual divide a Sup35p en tres dominios (**Figura 4**): i) un dominio N-terminal (N) que es rico en residuos polares sin carga (Liu y Lindquist, 1999), dividido a su vez en una región N-terminal rica en G/Q y una región con 5.5 repeticiones oligopeptídicas (OPR) imperfectas de la secuencia PQGGYQQYN. Esta secuencia recuerda a las repeticiones presentes en PrP (Ter-Avanesyan y col., 1994; Parham y col., 2001). La conformación nativa desestructurada de este dominio gobierna la formación de los núcleos (primordios amiloides) del prion. ii) La región central (M) altamente cargada, rica en residuos de lisina (18.5%) y glutamato (17.7%), solubiliza la proteína y promueve el estado no priónico soluble (Liu y col., 2002). Las regiones N y M gobiernan la habilidad de Sup35p de existir en dos estados, amiloide y soluble, y componen el dominio formador de prion (PrD) (Glover y col., 1997), que no se requiere para la funcionalidad de Sup35p como terminador traduccional (Ter-Avanesyan y col., 1993). Las secuencias primarias de estas regiones no están conservadas evolutivamente, aunque las proteínas Sup35p homólogas en otras levaduras contienen también expansiones polipeptídicas de longitud variable (Serio y Lindquist, 1999). iii) El dominio globular C-terminal confiere la actividad de terminación de la traducción y contiene cuatro sitios putativos de unión a GTP (Ter-Avanesyan y col., 1994; Liu y col., 1999; Parham y col., 2001), estando conservada evolutivamente (Serio y col., 2000).

Reed Wickner sugirió que Sup35p era capaz de provocar cambios fenotípicos heredables en levaduras vía un mecanismo basado exclusivamente en una proteína, siguiendo el mismo principio acuñado para PrP (Wickner, 1994; Wickner y col., 1995). Estudios genéticos, bioquímicos y celulares posteriores demostraron esta hipótesis y establecieron sus bases moleculares



(Chernoff y col., 1995; Glover y col., 1997). Ensayos de sedimentación diferencial demostraron que Sup35p, en células lisadas con fenotipo [*PSI<sup>+</sup>*], se encuentra en la fracción del sedimento, mientras que en las células [*psi<sup>-</sup>*] se localiza en el sobrenadante (Patino y col., 1996; Paushkin y col., 1997), indicando pues que el estado agregado de Sup35p es el determinante del fenotipo [*PSI<sup>+</sup>*]. La expresión de esta proteína fusionada a GFP permite monitorizar su dinámica en las células. La fluorescencia es difusa en las células [*psi<sup>-</sup>*], mientras que la proteína agrega formando focos en las células [*PSI<sup>+</sup>*] (Patino y col., 1996). El análisis *in vitro* de la proteína Sup35p purificada muestra que ésta existe en dos estados, uno de los cuales (el agregado) es capaz de dirigir el cambio conformacional de moléculas solubles a aquél mismo estado, formando fibras amiloides (Glover y col., 1997; King y col., 1997; Glover y Lindquist, 1998). De hecho, se pueden generar priones sintéticos *in vitro*, por ensamblaje de Sup35p, o de fragmentos NM, cuyas fibras amiloides pueden propagar el estado priónico al ser transfectadas (Shorter y Lindquist, 2005). Esta conversión de un estado funcional a un estado agregado fundamenta la naturaleza molecular del prion [*PSI<sup>+</sup>*].

Por último, el fenotipo [*PSI<sup>+</sup>*] se puede monitorizar también por ensayos con los genes reporteros *ADE1* o *ADE2*. Éstos se basan en el crecimiento y coloración de las colonias de *S. cerevisiae* que portan alelos *ade1* o *ade2* deficientes (presentan un codón sin sentido/*stop* en medio de sus ORF). Cuando se reprime la vía de síntesis de la adenina (por terminación prematura de la traducción de las proteínas Ade1p o Ade2p), el intermediario previo de la ruta no es procesado y se acumula. Este compuesto posee una coloración roja intensa produciendo una tonalidad de ese color en las colonias de levaduras. En las células [*psi<sup>-</sup>*], Sup35p se encuentra soluble, media la terminación prematura de la traducción y da lugar a la mencionada coloración roja. Por el contrario, en las células [*PSI<sup>+</sup>*], Sup35p se encuentra en el estado no funcional agregado priónico, por lo que se produce entonces una lectura corrida del codón *stop*, dando lugar a colonias blancas o con una coloración rosada (Wickner y col., 2007). Estos fenotipos son fácilmente reconocibles y, además, también se pueden monitorizar por medio del crecimiento o no en medios carentes de adenina. El fácil reconocimiento de los dos estados conformacionales de la proteína Sup35p permite utilizar el sistema priónico de levaduras [*PSI<sup>+</sup>*] como modelo para explorar el potencial amiloidogénico de secuencias heterólogas y, asimismo, caracterizarlas mediante el ensayo arriba descrito (Parham y col., 2001; Tank y col., 2007; von der Haar y col., 2007).

## 2.4. Otros agregados parcialmente amiloides

La naturaleza amiloide es común en muchos agregados de proteínas, pero existen otros mecanismos de agregación cuyas proteínas se disponen de una manera ordenada sin adoptar (al

menos no de una manera exclusiva) una estructura en lámina  $\beta$ -cruzada (Bennett y col., 2006; Eisenberg y col., 2006). Uno de tales ensamblajes, ordenado a la vez que rápido, es el de la seda de los artrópodos (fibroína), cuyo contenido estructural variable incluye desde hélices- $\alpha$  a láminas- $\beta$  y  $\beta$ -amiloides. Otro son los agregados de aspecto amorfo generados por estrés térmico o por concentración elevada de una proteína sobreexpresada, que al presentar cierto grado de contenido amiloide serán tratados con mayor detalle a continuación (Wang y col., 2010b).

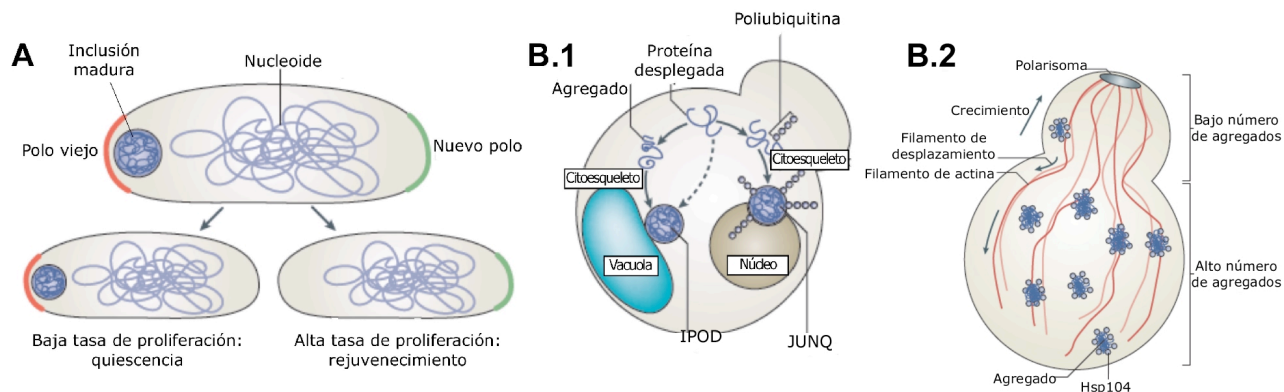
#### 2.4.1. Agregados intracelulares bacterianos: cuerpos de inclusión

Las proteínas cuando son expresadas en bacterias, a menudo agregan en forma de cuerpos de inclusión, que también pueden ser consecuencia del estrés térmico (Villaverde y Carrió, 2003; de Groot y col., 2009). La agregación en bacterias en forma de cuerpos de inclusión ocurre como un proceso reversible, mediado por una maquinaria celular específica. Los cuerpos de inclusión son estructuras dinámicas, que transitoriamente acumulan cadenas parcialmente desnaturalizadas de proteínas inestables para que puedan ser posteriormente procesadas, bien sea replegadas o proteolizadas. Las proteínas en los cuerpos de inclusión no son colecciones amorfas de proteínas desnaturalizadas, y pueden presentar estructuras amiloides (Wang y col., 2008) y/o mantener en buena medida su conformación nativa, por lo que pueden ser funcionales (Villaverde y Carrió, 2003). Aun así, la estructura fibrilar en ellas no es obvia, pues las inclusiones se forman también por la deposición irregular de otras proteínas, como chaperonas y componentes ribosómicos e incluso ácidos nucleicos. Las proteínas también se pueden acumular formando cuerpos de inclusión debido a mutaciones o por errores en la transcripción o traducción, pudiendo pues agregar fuera de las condiciones de estrés (Mogk y col., 2003). En *E. coli*, hasta un 1.5-3% de las proteínas totales citosólicas pueden agregar y las inclusiones individuales pueden contener de 2.400 a 16500 moléculas de proteína. Cualitativamente, entre 15 y 200 proteínas distintas son vulnerables a la desnaturalización térmica y agregación (Winkler y col., 2010).

Los cuerpos de inclusión se acumulan en las bacterias normalmente en número reducido (1 ó 2 por célula) y en posición subpolar o central (**Figura 5.A**). Sufren una herencia asimétrica en la división y se acumulan en uno de los polos preexistentes, conllevando una disminución de la proliferación celular (envejecimiento) con respecto a la células que heredan los dos polos nuevos. Esto indica que las bacterias son capaces de segregar las proteínas dañadas a expensas del envejecimiento individual, para permitir así la perpetuación de la población (**Figura 5. A**) (Lindner y col., 2008).

En *E. coli* la disposición de los agregados en el polo viejo se realiza a través de un mecanismo que no está muy claro. De hecho, existen opiniones opuestas al respecto, pues mientras algunos estudios apoyan que la distribución está dirigida por un mecanismo activo (Rokney y col., 2009), otros sostienen que ocurre a través de un mecanismo pasivo impuesto por

la oclusión del nucleóide, que sería suficiente para dirigir el destino de los agregados (Winkler y col., 2010).



**Figura 5.** Esquema de la distribución asimétrica de las inclusiones de proteínas agregadas en *E. coli* (A) y en *S. cerevisiae* (B). (A) Las inclusiones en *E. coli* se localizan en el polo viejo de las células y se mantienen en él. Las células que las portan presentan una reducción de su tasa de crecimiento. La exclusión de los agregados por el nucleóide parece dirigir su distribución intracelular. (B.1) Las células de levaduras poseen dos compartimentos de “control de calidad” para la deposición de proteínas: el compartimento yuxtannuclear (JUNQ) y el depósito de proteínas insolubles perivacuolar (IPOD). Proteínas solubles, desplegadas y ubiquitiniladas se disponen en el JUNQ, mientras que proteínas insolubles y agregados térmicos pueden acumularse en el IPOD. Alteraciones en el citoesqueleto perturban la localización de ambos compartimentos. (B.2) Grandes agregados de proteínas carboniladas y agregados inespecíficos se mantienen en la célula madre durante la división celular. Los filamentos de actina, el polarisoma y la chaperona Hsp104 son requeridos para la distribución asimétrica de aquéllos, que se lleva a cabo mediante la asociación de los agregados a los cables de actina a través de Hsp104, reteniéndolos así en la célula madre. La herencia asimétrica de las proteínas dañadas es una estrategia para no lastrar la división de la progenie (rejuvenecimiento). Esquema adaptado de Tyedmers y col. (2010).

#### 2.4.2. Deposición de agregados proteicos en levaduras

Cuando células de la levadura *S. cerevisiae* se someten a estrés térmico, los focos de proteínas agregadas de distintos tamaños se dispersan a lo largo del citoplasma y del núcleo y no existe una compartimentalización específica para este tipo de agregados que, por otra parte, pueden ser reactivados por chaperonas (Parsell y col., 1994).

Las proteínas que no están plegadas en la forma nativa incluyen proteínas que poseen daño oxidativo, otras que se marcan por ubiquitinización para su degradación y proteínas amiloidogénicas como los priones (Tyedmers y col., 2010a). El patrón de distribución de los agregados es diverso y existen varias maneras de organizarlos, pues se han descubierto dos compartimentos celulares donde pueden localizarse (Kaganovich y col., 2008). Uno de ellos, denominado JUNQ, es adyacente a la membrana nuclear y acumula proteínas desnaturalizadas que están ubiquitiniladas y son pues potenciales sustratos para la degradación proteolítica. JUNQ es un compartimento móvil en el citoplasma. El segundo compartimento se encuentra adyacente a la vacuola y se denomina IPOD (**Figura 5.B.1**). Contiene agregados terminales, proteínas insolubles y amiloidogénicas, incluyendo priones como  $[RNQ^+]$ ,  $[URA3^+]$  y  $[PSI^+]$  (Tyedmers y col., 2010b). Cuando las proteínas desnaturalizadas terminales no son transferidas a los proteasomas,

se depositan en el compartimento IPOD de manera permanente, donde también se acumulan proteínas dañadas por oxidación. La disposición de los agregados en este compartimento dirige su herencia asimétrica, debido a la polaridad de la localización del IPOD (Tyedmers y col., 2010b), que es retenido por la célula madre durante la división. Parece que este proceso implica al citoesqueleto de actina (Aguilaniu y col., 2003) y a la chaperona Hsp104. Esta última está involucrada en establecer la polaridad mediando la interacción de los agregados con los componentes de la maquinaria citoesquelética de la división (polarisoma y anillo de septina) (**Figura 5.B.2**), lo que sugiere que existe una conexión entre la formación de las yemas y el sistema de control de calidad de los agregados de proteínas (Tessarz y col., 2009). Ambos compartimentos también se han identificado en células de mamífero (Kaganovich y col., 2008).

### **3. FACTORES MODULADORES DE LA AMILOIDOGÉNESIS DE PROTEÍNAS**

#### **3.1. Chaperonas**

Las chaperonas intervienen en el plegamiento de proteínas agregadas y de proteínas plegadas incorrectamente. Además, estabilizan a los intermediarios proteicos que forman parte de complejos macromoleculares, siendo así componentes principales de la maquinaria de control de calidad de las proteínas celulares (Mayer, 2010; Tyedmers y col., 2010a). También están directamente implicadas en la amiloidogénesis de proteínas. Las chaperonas se clasifican en diferentes familias de acuerdo con su secuencia, estructura 3D y naturaleza funcional y son proteínas que se expresan en elevados niveles en todo tipo de células, no sólo bajo condiciones de estrés.

##### **3.1.1. Chaperona DnaK**

###### **i. Mecanismo de acción de Hsp70**

Las chaperonas asisten al plegamiento nativo de un 10-20% de las proteínas en las bacterias. El plegamiento eficiente por parte de la chaperona Hsp70 de *E. coli*, DnaK, se correlaciona con el tamaño de la proteína sustrato (Bukau y col., 2000). Del mismo modo, DnaK sola es eficiente en solubilizar y plegar agregados por debajo de 10 moléculas; agregados de mayor tamaño sólo pueden ser parcialmente solubilizados por ésta, incluso cuando se encuentra en exceso (Diamant y col., 2000). Por el contrario, en presencia de la disgregasa ClpB (Hsp104) los grandes agregados se solubilizan más eficientemente, sobre todo cuando ambas chaperonas se encuentran en cantidades estequiométricas (Mayer y Bukau, 2005).

La familia de las Hsp70s es ubicua filogenéticamente y está formada por dos dominios especializados, acoplados alostéricamente a través de una región conectora intermediaria: el N-terminal, que es el dominio de unión al ATP (NBD), y el C-terminal, que es el dominio de unión al

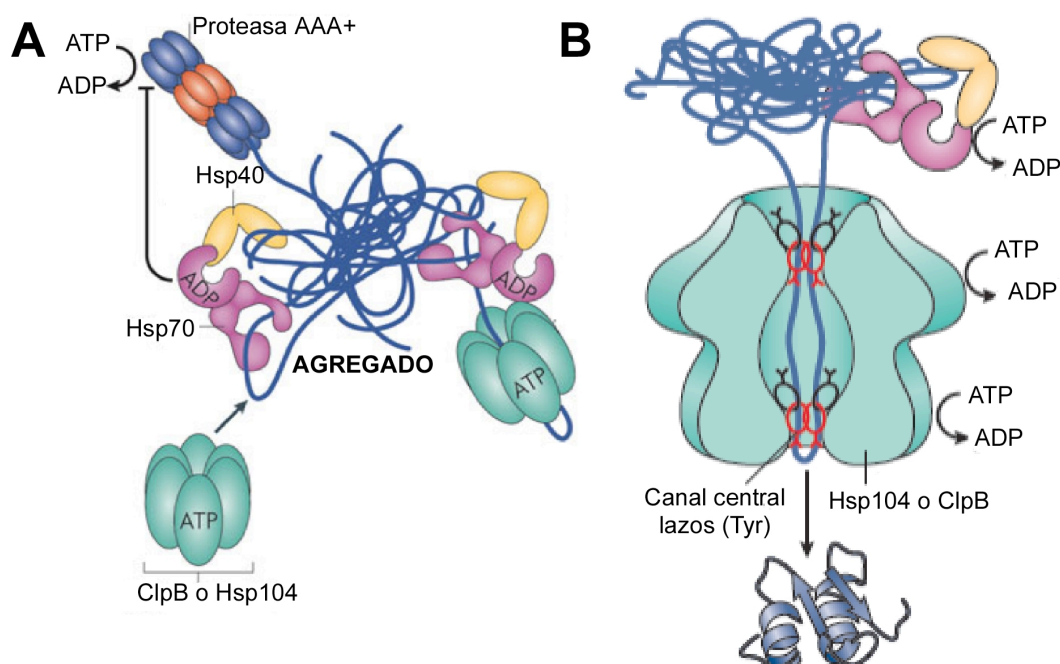
sustrato (SBD). Este último está formado por un subdominio de unión al péptido sustrato y otro subdominio (o “tapadera”)  $\alpha$ -helicoidal. Hsp70 desempeña el papel funcional central pero actúa coordinadamente con dos tipos de cofactores proteicos que (i) se unen previamente a los sustratos adecuados, estimulando la hidrólisis de ATP en el dominio NBD de Hsp70 (Hsp40 o dominios J) (Jiang y col., 2007); y (ii) fomentan el intercambio de ADP por ATP tras la hidrólisis de nucleótidos (factores de intercambio de nucleótidos, NEFs) (Harrison y col., 1997; Polier y col., 2008; Schuermann y col., 2008). El ciclo funcional de Hsp70 (Mayer y col., 2000; Moro y col., 2006; Swain y col., 2007) comienza con el cierre del subdominio tapadera del SBD, unido al segmento peptídico hidrofóbico del sustrato que, junto con Hsp40, dirige la hidrólisis de ATP en el dominio NDB y las translaciones estructurales en el sustrato. A continuación, se produce el desplazamiento del ADP residual (llevado a cabo por NEF) y la apertura de la tapa del dominio SDB que, tras unirse alostéricamente una nueva molécula de ATP en el NBD, libera el sustrato y se cierra con ello el ciclo. La fase limitante y lenta de dicho ciclo es el cierre de la tapadera del SDB cuando se une al sustrato, mientras que la fase de equilibrio de unión/intercambio de ATP es rápida. De modo que el estado unido a ATP posee baja afinidad por el sustrato y rápido intercambio, mientras que el estado generado tras la hidrólisis del nucleótido a ADP posee alta afinidad por el sustrato y baja tasa de intercambio. Este mecanismo molecular ha sido estudiado también en detalle en Hsp70 homólogas, que presentan diferencias en sus ciclos, lo que conlleva implicaciones en su actividad (Mayer y Bukau, 2005).

Las chaperonas son pues maquinarias macromoleculares que convierten la energía libre de la unión e hidrólisis de ATP en movimientos interdominios, que son transducidos a los sustratos (proteínas unidas), que resultan en el plegamiento/desplegamiento, ensamblaje/disgregación o degradación proteolítica de los mismos (Bukau y col., 2006).

### ii. Hsp104 y acción conjunta con Hsp70 en la disgregación

Para la solubilización de los agregados, las Hsp104 no interactúan con peptidasas para llevar a cabo su función, si no que lo hacen con Hsp70. El dominio M de Hsp104 y Hsp70 tienen papeles esenciales, ya que proveen la fuerza que facilita la extracción de proteínas desplegadas de los agregados (Weibezahn y col., 2005). Para contrarrestar la agregación de proteínas, dos tipos de chaperonas actúan coordinadamente: la triada Hsp70-Hsp40-NEF y la disgregasa hexamérica Hsp104 (**Figura 6**) (Glover y Lindquist, 1998; Goloubinoff y col., 1999). Gracias a la unión e hidrólisis de ATP ambas chaperonas pueden desensamblar los amiloides, cuyo producto final son proteínas solubles, monoméricas y menos tóxicas. Hsp70 asistida por sus dos cofactores, extrae oligómeros a partir de los grandes agregados y, uniéndose a la entrada del canal axial del hexámero de Hsp104, presenta los péptidos desplegados parcialmente a esta última chaperona (Zietkiewicz y col., 2006; Haslberger y col., 2010). Las proteínas son entonces

desnaturalizadas e introducidas dentro del anillo de Hsp104 por un ciclo ATPásico, que genera un desplazamiento vectorial del sustrato impulsado por residuos de tirosina que se encuentran en los dos dominios AAA+ a la par que se torsiona el dominio *coiled-coil* (M) de Hsp104. Este movimiento coordinado en el que Hsp70 actúa como cofactor, a través de su unión a los dominios M y AAA+, extrae una cadena de proteína individual a partir del sustrato oligomérico (**Figura 6**) (Tyedmers y col., 2010a).



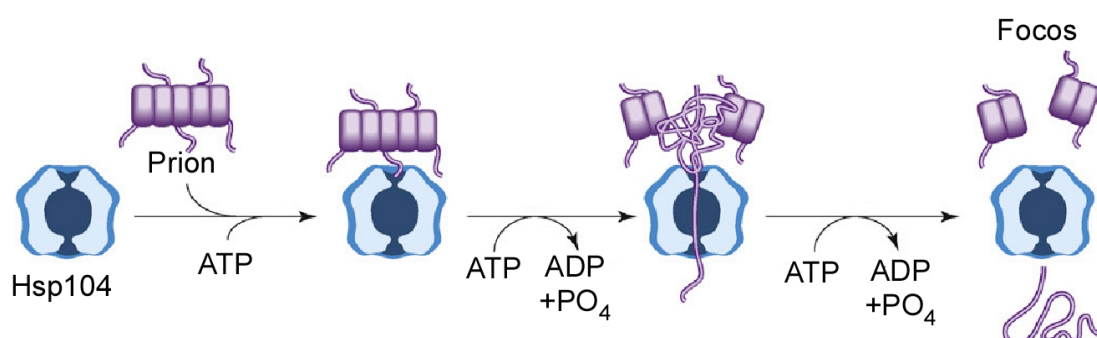
**Figura 6.** Detalle del mecanismo de disgregación del sistema bichaperona Hsp104-Hsp70. (A) El complejo de Hsp70 y su cochaperona Hsp40 interactúa con los agregados. La unión a Hsp70-40 tiene dos funciones, primero restringe el acceso de proteasas a los agregados y segundo, permite la transferencia del sustrato a la disgregasa Hsp104. (B) Esta transferencia requiere el contacto físico entre las chaperonas o la exposición de regiones del agregado, que se unen a ClpB/Hsp104. La disgregación está regulada por la desnaturalización e introducción de la cadena polipeptídica en el canal. La unión e hidrólisis de ATP es lo que causa el cambio conformacional que, generando una fuerza de tracción, dirige el desplazamiento del sustrato a través del hexámero Hsp104. Figura adaptada de Tyedmers y col. (2010).

El ortólogo bacteriano de Hsp104, ClpB, también promueve la disgregación de proteínas bajo estrés térmico y está implicada en la disgregación de los cuerpos de inclusión (Carrió y Villaverde, 2005). La actividad remodeladora en Hsp104 no está tan conservada como en ClpB, aunque está descrito que ha sido no es capaz de disgregar amiloides (Shorter y Lindquist, 2004; Tipton y col., 2008; Garrity y col., 2010). El mecanismo de disgregación, a través de la extracción de polipéptidos de los agregados y reactivación, es similar en ambas. Para realizar esta actividad, ClpB trabaja en colaboración con la chaperona Hsp70, DnaK (Doyle y Wickner, 2009). En *E. coli* la disgregación es llevada a cabo por la actividad ATPásica de chaperonas en la que DnaK es protagonista, asistida por DnaJ, GrpE, ClpB y GroEL (Ben-Zvi y Goloubinoff, 2001). DnaK interactúa con el sustrato a través de residuos hidrofóbicos expuestos en los agregados (Goloubinoff y col., 1999) y se lo presenta al canal de procesamiento de ClpB (**Figura 6**). Ésta

utiliza, al igual que Hsp104, una actividad ATP-dependiente para la remodelación (Haslberger y col., 2010).

### 3.1.2. Prion [*PSI*<sup>+</sup>]: chaperonas Hsp70 y Hsp104

El amplio estudio del prion de levaduras [*PSI*<sup>+</sup>] ha permitido conocer en detalle el papel de las chaperonas en la generación y mantenimiento de los priones. En levaduras, Hsp104p puede por sí sola, desorganizar las fibras amiloides de Sup35p y generar propagones transmisibles (**Figura 7**) (Shorter y Lindquist, 2004; 2006), aunque lo hace más eficientemente cuando Hsp70, actúa coordinadamente junto con sus cochaperonas Hsp40, Sis1p o Ydj1p (Shorter y Lindquist, 2008; Newnam y col., 2011). Altos niveles de Hsp104p conllevan la pérdida del prion [*PSI*<sup>+</sup>], pues se altera el balance entre Hsp70-Hsp104 y no se produce la fragmentación necesaria para que los agregados se transmitan en la división celular. El fenómeno de pérdida del prion se llama “curación” (Shorter y Lindquist, 2004), término que proviene de la denominación clásica para la pérdida de plásmidos en bacterias. Asimismo, se ha visto que Hsp104p (ver apartado **Introducción 2.4.2**) está involucrada en el control de la distribución asimétrica de los agregados en la división (Erjavec y col., 2007; Tessarz y col., 2009).



**Figura 7.** Modelo de acción de Hsp104. Hsp104 es capaz de escindir los priones de levaduras generando propagones. En presencia del ATP, Hsp104 interacciona con las fibras vía exposición de fragmentos desplegados. Por analogía con el mecanismo de acción de Hsp104 para otros sustratos, se muestra que el segmento promotor se extrae de la fibra por desnaturalización, se introduce en el canal de Hsp104 y se libera utilizando la energía de la hidrólisis del ATP. El resultado final genera nuevos primordios, multiplicando así los extremos disponibles, que serán nuevos moldes para el crecimiento de las fibras. Figura adaptada de Doyle y col. (2009).

En levaduras existen dos subfamilias de genes parálogos *HSP70* (*SSA1-4* y *SSB1-2*) que codifican seis proteínas con alta similitud estructural y que poseen sutiles diferencias funcionales (Allen y col., 2005; Albanèse y col., 2006). La existencia de tantas *HSP70* isogénicas hace que las evidencias sobre el papel de las chaperonas sean divergentes y, en muchos casos, conflictivas. Mientras que Ssa1-2p se expresan constitutivamente, Ssa3-4p lo hacen bajo condiciones de estrés. Éstas últimas promueven la amiloidosis de Sup35p, la cual se convierte en prion [*PSI*<sup>+</sup>]. Por otro lado, Ssb1-2p ayudan al plegamiento nativo de la proteína Sup35p según es sintetizada

en los ribosomas (Newnam y col., 1999; Allen y col., 2005; Albanèse y col., 2006). Cuando se sobreexpresa Hsp104p, las subfamilias Ssa y Ssb tienen funciones opuestas, pues la primera promueve la amiloidosis del prion, mientras que la segunda no: Ssa estabiliza la forma desplegada de Sup35p que es competente para la formación del prion, mientras que Ssb promueve el plegamiento de Sup35p a una conformación no priónica, o la etiqueta para la degradación (Greenwald y Riek, 2010). Sin embargo, la sobreexpresión de Ssa1-2p puede terminar por eliminar el prion [*PSI*<sup>+</sup>] ya que incrementa el tamaño de los agregados dificultando así su transmisión (Mathur y col., 2009).

Cuando se realizan estudios similares en otros priones, como [*URE3*<sup>+</sup>], también emergen diferencias con las actividades descritas para los componentes de las subfamilias de chaperonas (Sharma y col., 2011). Al igual que [*URE3*<sup>+</sup>], otros priones de levaduras también requieren de la actividad de Hsp104 para su propagación pero, a diferencia de [*PSI*<sup>+</sup>], no son eliminados cuando se sobreexpresa Hsp104p (Newnam y col., 2011).

Las chaperonas Hsp70 parecen actuar primeramente sobre la compactación del ensamblaje amiloide y después presentan las regiones péptidicas reclutadas a la chaperona Hsp104 (Tipton y col., 2008). El balance entre las actividades de la disgregasa Hsp104p y la chaperona Hsp70 es pues el responsable de mantener el tamaño y el número correcto de los núcleos fibrilares para la propagación, imprescindibles para la infectividad del prion. El papel proteostático de las chaperonas demuestra la importancia del equilibrio entre la expresión de las proteínas amiloidogénicas y su plegamiento (Greenwald y Riek, 2010).

### 3.1.3. Hsp70 y Hsp104 en proteinopatías amiloides

Los metazoos, en cambio, no poseen un homólogo de Hsp104, por lo que el mecanismo por el cual estas células neutralizan los grandes agregados proteicos queda todavía por esclarecer. Muchas proteínas de la familia AAA+ han sido propuestas para dicha función, como por ejemplo la proteína p97, que parece actuar como disgregasa e incluso regula el desplegamiento amiloide, actuando entonces como chaperona molecular, de modo que previene la agregación de manera similar a Hsp104 (Kobayashi y col., 2007). Además, puede colaborar con las chaperonas Hsp70 y Hsp40 para plegar confórmeros desnaturalizados solubles (Shorter, 2011). Sin embargo, no existen evidencias plenamente convincentes. Asimismo, se ha establecido que Hsp110, la chaperona que actúa como el factor intercambiador de nucleótidos (NEF) de Hsp70, es necesaria, y coopera en la disgregación y reactivación de agregados en el citosol de mamíferos (Shorter, 2011). En cambio, como se expone a continuación, la mayor parte de las evidencias descritas hasta la fecha apuntan a que Hsp70 es la chaperona más importante en la disgregación de los amiloides, causantes de enfermedades neurodegenerativas:



## i. PoliQ

En las enfermedades causadas por proteínas con poliglutaminas (poliQ) se ha descrito que Hsp70 y Hsp40 actúan en la solubilización *in vitro* de los agregados de fragmentos de huntingtina, que poseen expansiones de poliQ. A través de un mecanismo dirigido por ATP, Hsp70 genera agregados amorfos y solubilizables por detergentes. La expresión de estas chaperonas en levaduras impide la formación de grandes agregados de poliQ. Asimismo, se ha descrito que aumentos de la expresión de Hsp70 y Hsp40 pueden suprimir la neurodegeneración mediada por proteínas con poliQ en *Drosophila*, sin impedir la agregación de las mismas (Warrick y col., 1999). Hsp70 y Hsp40 cooperan para unirse a fragmentos hidrofóbicos de polipéptidos desplegados de una manera ATP-dependiente, liberándolos tras la hidrólisis del ATP (Bukau y Horwich, 1998). Ambos suprimen la neurodegeneración retrasando la acumulación de los agregados amiloides y de sus precursores (Muchowski y col., 2000), protegiendo así a las células frente a las formas tóxicas de poliQ (Muchowski y col., 2000).

## ii. Tau

Los miembros de la familia de Hsp70 son inhibidores potentes de la agregación de tau *in vitro*, uniéndose preferentemente a los oligómeros de dicha proteína, impidiendo la formación de fibras maduras e intermediarios oligoméricos. Esto previene el efecto tóxico de tau en el transporte axonal. Hsp70 interacciona con tau a través de dos regiones hidrofóbicas de la proteína que se encuentran más expuestas en los agregados prefibrilares y son además regiones esenciales para la agregación de tau (Patterson y col., 2011). Hsp70 no puede actuar sobre los agregados preexistentes, pues éstos son muy estables y su región hidrofóbica esta mayoritariamente enterrada en la fibra, por lo que Hsp70 difícilmente puede revertir el cambio conformacional una vez que ha ocurrido: Hsp70 actúa por lo tanto impidiendo el cambio al estado conformacional amiloide que resultará en fibras. No obstante, las cochaperonas (Hsp40 y Hsp90) aumentan la actividad de Hsp70 *in vivo* (Langer y col., 1992), secuestrando a tau de modo que la alejan de la vía de agregación.

## iii. $\alpha$ -sinucleína

También se ha descrito que Hsp70 inhibe el ensamblaje amiloide de la  $\alpha$ -sinucleína *in vitro*. Con cantidades subestequiométricas de la proteína Hsp70 purificada y en ausencia de cofactores, se ha visto que la interacción entre ambos se realiza a través del dominio de unión a sustrato de Hsp70 y el núcleo hidrofóbico de  $\alpha$ -sinucleína. Se ha visto también que Hsp70 reconoce las especies solubles de la  $\alpha$ -sinucleína de una manera muy dinámica y reversible, de modo que impide la agregación de la  $\alpha$ -sinucleína, que conserva su estado monomérico tras la exposición a Hsp70 (Luk y col., 2008). También *in vitro* Hsp70 puede impedir el ensamblaje fibrilar de la misma (Dedmon y col., 2005), inhibiendo las capacidades de nucleación y elongación de las especies

prefibrilares y fibras, respectivamente (Luk y col., 2008). Se ha descrito que elevados niveles de Hsp70 reducen la acumulación y toxicidad de  $\alpha$ -sinucleína en ratón y *Drosophila* (Auluck y col., 2002; Klucken y col., 2004), ya que la chaperona desestabiliza las especies tóxicas en la célula.

#### iv. Péptido A $\beta$

El papel de Hsp70 también parece determinante en la enfermedad de Alzheimer. La sobreexpresión de Hsp70 provee citoprotección frente al péptido A $\beta$ , inhibiendo su oligomerización o estimulando su fagocitosis (Miners y col., 2008). La sobreexpresión de *HSP70* en ratón suprime el fenotipo patogénico y funcional de la enfermedad (déficit cognitivo, aprendizaje espacial y memoria), a través de un efecto de antiagregación y neuroprotección. Se ha propuesto que la sobreexpresión de *HSP70* activa a la microglia, lo que conlleva la disminución del péptido A $\beta$ . Además, la actividad de antiagregación se ha propuesto *in vitro* (Muchowski y Wacker, 2005; Yoshiike y col., 2008): Hsp70/40 y Hsp90 bloquean el ensamblaje del péptido A $\beta$  en cantidades subestequiométricas (1:50) a través de un proceso mediado por ATP. La acción de estas chaperonas recae sobre los oligómeros y no en las fibras, por lo que suprimen las etapas tempranas del autoensamblaje (Evans y col., 2006). En muchos modelos de enfermedades neurodegenerativas se ha propuesto el potencial terapéutico beneficioso de Hsp70 (Yamashita y col., 2010; Hoshino y col., 2011).

#### 3.1.4. Transmisibilidad molecular

La variante agregada oligomérica de la proteína PrP promueve la transformación conformacional de PrP<sup>C</sup> al estimular el desplegamiento parcial de ésta cuando se incorpora al amiloide PrP<sup>Sc</sup> (Collinge y Clarke, 2007). Este mecanismo, válido también para los priones en levaduras, hace incrementar progresivamente el tamaño de los agregados del prion. Pero la polimerización de los complejos no puede sustentar por sí misma el aumento exponencial de los niveles de infección durante el transcurso de la enfermedad, ni la estabilidad mitótica del prion durante la propagación (Tuite y Serio, 2010). Los modelos matemáticos de la propagación de priones sugieren que tiene que existir, además de la polimerización de los primordios, una fragmentación del prion por parte de las chaperonas moleculares, de modo que se generan nuevos moldes llamados “propagones” (Masel y col., 1999). La multiplicación por ruptura de los agregados y reclutamiento de la proteína nativa se denomina transmisibilidad molecular (Aguzzi, 2009) y asegura un nivel celular elevado del determinante epigenético priónico.

### 3.2. Ácidos nucleicos y otros cofactores polianiónicos

Existen otros elementos en la célula, a parte de la actividad de las chaperonas, capaces de inducir el desplegamiento parcial de las proteínas y de dirigir su conversión amiloide. Por ejemplo, los ácidos nucleicos son factores alostéricos responsables de la conversión conformacional de la

proteína PrP *in vitro*. El dominio globular C-terminal de PrP sufre un cambio estructural de hélice- $\alpha$  a hebra- $\beta$  cuando se une a ácidos nucleicos (ARN o ADN) que promueven la agregación (Silva y col., 2010). PrP reconoce los ácidos nucleicos con alta afinidad pero con baja especificidad de secuencia (Silva y col., 2008). De hecho, se ha sugerido que los polianiones endógenos pueden acelerar la tasa de infección del prion al actuar como armazón o entramado, produciendo una reducción de la movilidad de las proteínas, de modo que las interacciones entre las moléculas PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>Sc</sup> son más probables, modulando así la conversión por modelado conformacional (Silva y col., 2008). Por otro lado, se baraja la posibilidad de que PrP<sup>C</sup> tenga un efecto protector frente al daño inducido por especies reactivas de oxígeno al ADN, desempeñando entonces la interacción de PrP con el ADN un papel fisiológico en la célula (Watt y col., 2007).

La técnica *in vitro* PCMA (amplificación cíclica del plegamiento incorrecto de proteínas) ha permitido avanzar en la búsqueda de posibles factores involucrados en la conversión amiloide de proteínas. Esta técnica está basada en el principio de propagación de PrP<sup>Sc</sup> y consiste en ciclos de conversión de proteína desnaturalizada seguida de sonicaciones, generando nuevos primordios de nucleación (Castilla y col., 2005). Se ha visto que la transformación conformacional eficiente de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup> requiere ARN (Deleault y col., 2007) y que además, son los ARNs de mamífero (no los de invertebrados) los que promueven la amplificación más eficientemente (Deleault y col., 2010). Secuencias sintéticas de poli(A) son capaces de promover la generación de partículas infectivas a partir de PrP<sup>C</sup> purificada de hámster, pero recientemente también se ha conseguido con PrP recombinante de *E. coli*. También se ha visto mediante PCMA que existen otros ligandos polianiónicos como los glicosaminoglicanos y los fosfolípidos que incrementan la replicación del prion PrP<sup>Sc</sup> (Cordeiro y col., 2001; Silva y col., 2010; Wang y col., 2010a).

La proteína CEPB, involucrada en la plasticidad de la memoria en metazoos, es una proteína de unión a ácidos nucleicos que actúa como reguladora de la traducción (apartado **Introducción 2.2.B**). Curiosamente, la unión de las moléculas de ARNm a CEPB genera un efecto alostérico sobre su amiloidogénesis (Si y col., 2010).

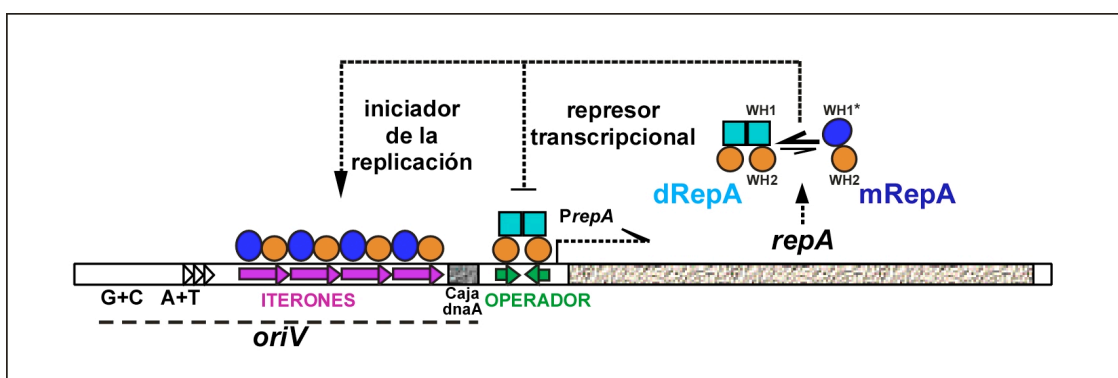
La localización nuclear de la  $\alpha$ -sinucleína sugirió que ésta podía poseer capacidad de interacción con los ácidos nucleicos. Ensayos de replicación *in vitro* (PCMA), demuestran que la amiloidogénesis de la  $\alpha$ -sinucleína también depende de cofactores como los ácidos nucleicos (Hegde y col., 2010). Se ha descrito que fragmentos de ADN de doble cadena inducen el desplegamiento parcial de la proteína y promueven su agregación, mientras que ADN de cadena sencilla, circulares o superenrollada protegen a la proteína de la fibrilación. También se ha visto interacción del péptido-A $\beta$  amiloide con el ADN.

Se ha sugerido que la unión al ADN debe de ser una propiedad común de muchas proteínas amiloidogénicas asociadas con desórdenes neurodegenerativos (Hegde y col., 2010). El papel de

los ácidos nucleicos como efectores alostéricos de la amiloidogénesis puede ser un fenómeno frecuente, ya que muchas proteínas amiloides, al menos en levaduras, en su estado nativo pueden desempeñar funciones en la regulación de la traducción o transcripción.

#### 4. LA PROTEÍNA MULTIFUNCIONAL RepA DEL PLÁSMIDO pPS10

Durante más de 15 años nuestro laboratorio ha estudiado el mecanismo responsable de la activación de dímeros de la proteína RepA (dRepA) del plásmido pPS10 de *Pseudomonas*, que actúan como represores transcripcionales del gen *repA*, en monómeros (mRepA) competentes para iniciar la replicación del ADN (**Figura 8**) (revisado en Giraldo y Fernández-Tresguerres, 2004).



**Figura 8.** Esquema del replicón del plásmido pPS10 (no dibujado a escala). Se representa el origen de replicación *oriV*, compuesto por cuatro repeticiones de los iterones (flechas moradas), más el sitio de unión del iniciador cromosómico DnaA (caja dnaA) y las regiones conservadas en otros replicones ricas en G+C y A+T. El gen *repA* codifica para la proteína iniciadora RepA. La proteína RepA es dimérica en solución y se une con gran afinidad a las repeticiones invertidas del operador (flechas verdes) de 8 pb, reprimiendo así la transcripción de *repA*. Por el contrario, los monómeros, menos abundantes, se unen cooperativamente a los iterones para iniciar la replicación plasmídica. RepA está compuesta por dos dominios *winged-helix* (WH), siendo el N-terminal (WH1) quien experimenta el cambio conformacional desde dímero (coloreados azul celeste) a monómero (óvalos azules oscuros).

##### 4.1. RepA en la replicación de pPS10

RepA reconoce una secuencia de 8 pb en dos orientaciones alternativas: como repetición invertida (en el operador, diana de dRepA) o como repeticiones en tándem (iterones, unión de mRepA). RepA está constituida por dos dominios *winged-helix* (WH), actuando el primero de ellos (WH1) en la dimerización de la proteína y el segundo (WH2) en la unión al ADN (Giraldo y col., 1998).

En común con muchas proteínas amiloidogénicas, la unión alostérica de una secuencia específica del origen de replicación de pPS10 (iterón) hace que RepA sufra una conversión de hélice- $\alpha$  a lámina- $\beta$ , que afecta a 3 hélices del dominio N-terminal WH1, involucrado en la dimerización (WH1, residuos 1-132 de RepA) (Giraldo y col., 2003). Este cambio conformacional conlleva la disociación del dímero y la activación de WH1 para convertirse en un dominio de unión

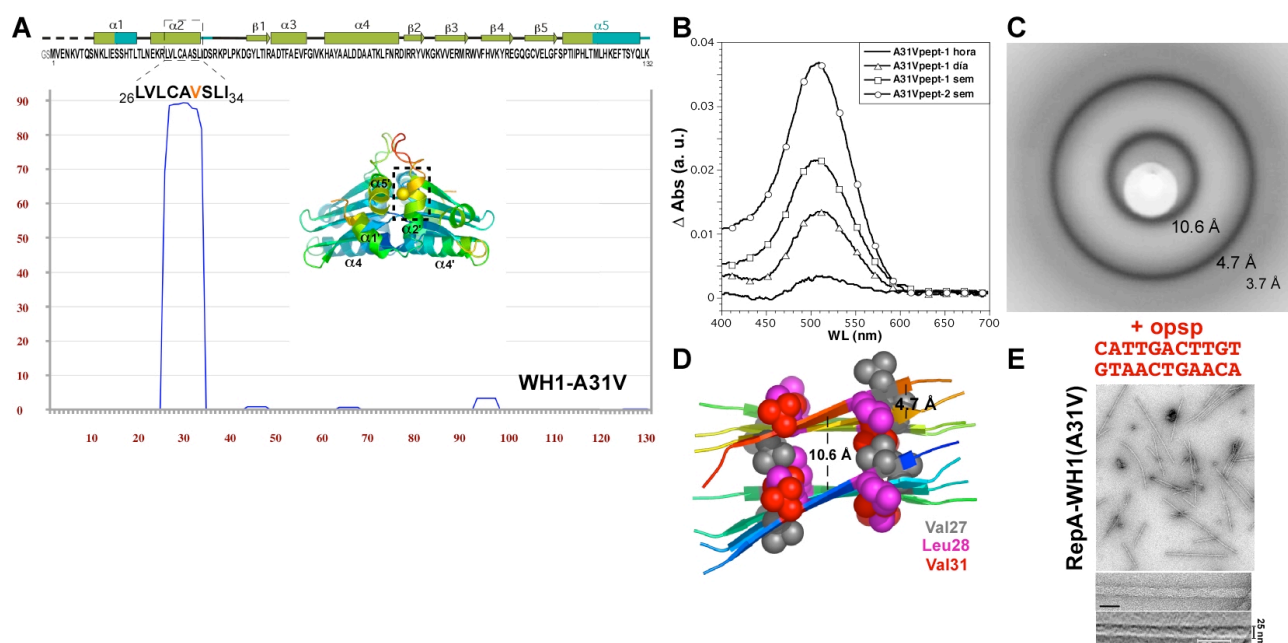
a ADN (subsidiario al dominio C-terminal de WH2) (Giraldo y col., 1998). La unión del dímero a una sola copia del iterón es suficiente para inducir la disociación y la transformación estructural, mientras que la unión al operador no tiene mayor efecto en la estructura de los dímeros (Díaz-López y col., 2003; 2006). La conversión de los dímeros de RepA-WH1 a monómeros implica un desplegamiento parcial de las subunidades de la proteína e incrementa la superficie accesible al solvente (Giraldo y col., 2004), resultando en un intermediario metaestable transitorio que tiene tendencia a agregar (Díaz-López y col., 2003; 2006). Los dímeros de WH1 aislados son termoestables y resistentes a la actividad proteolítica (Giraldo y col., 1998). Este comportamiento complejo ha sido caracterizado mediante técnicas de dicroísmo circular (DC) y espectroscopía de fluorescencia e hidrodinámica (Giraldo y col., 1998; Díaz-López y col., 2003; 2006), cristalografía (Giraldo y col., 2003) y modelado molecular (Giraldo y Fernández-Tresguerres, 2004).

En la activación de la replicación plasmídica, mRepA construye sobre los iterones un complejo nucleoproteico que inicia la replicación del ADN al desestabilizar la doble hélice y atraer hacia el origen a los factores de la replicación de la célula huésped (helicasa, primasa, ADN polimerasa) (**Figura 8**). Una vez que se ha completado la replicación plasmídica, RepA mantiene el número de copias del plásmido bajo control: interacciones entre los dominios WH1 de moléculas de mRepA unidas a dos copias plasmídicas recién replicadas constituyen un filamento nucleoproteico que inhibe nuevas rondas de replicación prematuras (Gasset-Rosa y col., 2008a).

## 4.2. Amiloides RepA-WH1

Los cambios conformacionales experimentados por RepA-WH1 en la disociación, similares a la transformación que sufren las proteínas amiloides (Chiti y Dobson, 2006), inspiraron la búsqueda de condiciones en las que se promoviera la amiloidogénesis de RepA-WH1 *in vitro* (Giraldo, 2007). Predicciones *in silico* apuntan a una región peptídica del dominio WH1 situada en el extremo C-terminal de la hélice- $\alpha 2$  y parte del lazo adyacente, L<sub>26</sub>VLCAASLI<sub>34</sub>, que presenta un alto potencial de agregación a través de láminas- $\beta$ , que se incrementa notablemente (a niveles similares a los que corresponden a las secuencias amiloidogénicas de proteínas implicadas en proteinopatías humanas) cuando se incluye una mutación puntual (A31V) (**Figura 9, 10**). Dicha mutación es funcional en la replicación de pPS10 (Giraldo, 2007; Gasset-Rosa y col., 2008b) y se aisló recurrentemente en búsquedas de variantes de RepA con el rango de huésped de pPS10 ampliado, o con su regulación alterada (Fernández-Tresguerres y col., 1995; Maestro y col., 2003; Gasset-Rosa y col., 2008a). Por otro lado, también se comprobó que otra mutación en el mismo residuo (A31S) disminuye el potencial de agregación (Giraldo, 2007). Dicho segmento peptídico está parcialmente enterrado en el dímero de WH1 en el núcleo hidrofóbico, pero queda expuesto al solvente en el monómero mWH1 (Giraldo y col., 2003). Cuando se incluyó el motivo

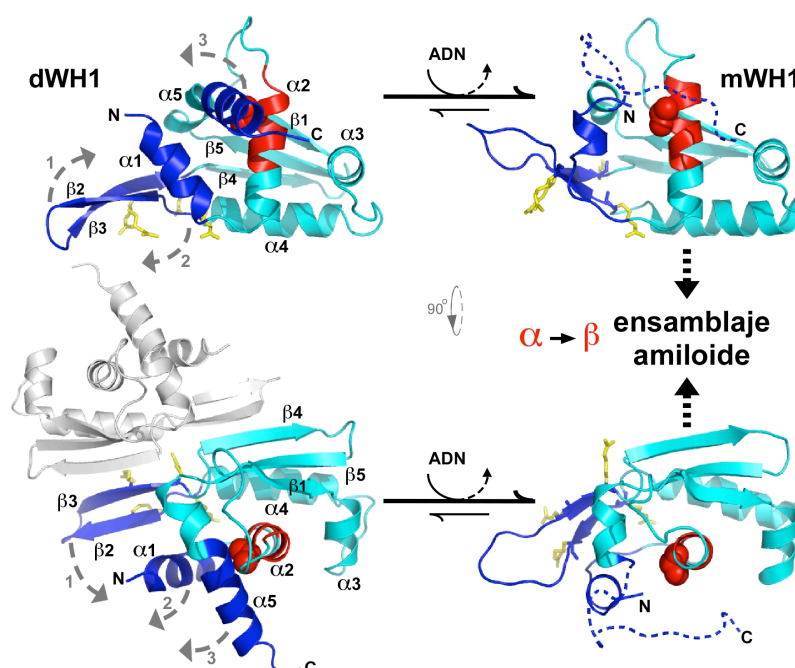
amiloidogénico L<sub>26</sub>VLCAASLI<sub>34</sub> en un péptido sintético, éste se ensambla *in vitro* en una estructura fibrilar (observable mediante microscopía electrónica de transmisión), con características biofísicas amiloides, pues forma una lámina- $\beta$  cruzada, según se desprende de estudios de espectroscopía de DC, de unión al rojo Congo y de difracción de rayos X (anillos a 4.7 Å y 10.6 Å) (**Figura 9**) (Giraldo, 2007).



**Figura 9.** Caracterización de la naturaleza amiloide de RepA-WH1(A31V). (A) La región amiloidogénica de RepA-WH1(A31V) como alto potencial de agregación (predicción realizada mediante el algoritmo TANGO) (B) Péptido que corresponde de esta región se une al colorante rojo Congo. Tras la incubación a lo largo de dos semanas, se observa cómo la absorbancia aumenta con el transcurso del tiempo. (C) Imagen resultante de la difracción de rayos X del péptido. Se muestran la resolución calculada para cada anillo de difracción que es característica de los ensamblajes- $\beta$  amiloides. (D) Modelo del ensamblaje del péptido RepA-WH1 (A31V). Se representan dos láminas- $\beta$  (distancia entre ellas es de 10.6 Å) formada por hebras- $\beta$  que se disponen antiparalelamente (distancia interhebra, 4.7 Å) (E) Micrografía electrónica de la proteína purificada de RepA-WH1(A31V) incubada con el oligonucleótido *opsp*. Se observa la formación de fibras largas y estrechas. La barra representa 200 nm. Se muestra también una vista ampliada (la barra representa 50 nm) que resalta los dos componentes protofibrilares que conforman la fibra. Todas estas propiedades determinan el carácter amiloide de RepA-WH1(A31V). Figura adaptada de Giraldo (2007).

La combinación del dominio WH1 con la mutación puntual A31V y secuencias específicas de 11 pares de bases del núcleo del operador (*opsp*) o de los iterones (5' *iter*) (Giraldo y col., 2003) dirigen el ensamblaje del dominio, cuya región amiloidogénica tiene localización distal a la superficie de unión a ADN. Se genera un amplio rango de estructuras amiloides, que abarcan desde agregados irregulares y esféricos regulares, a fibras ordenadas (Giraldo, 2007). El dominio WH1(A31V) forma fibras amiloides (visualizadas al ME y caracterizadas mediante unión a rojo Congo) de un ancho de 25 nm y aparentemente compuesta por protofilamentos trenzados (**Figura 9**). La clave determinante para la formación de este último ensamblaje es la unión con el oligonucleótido de doble cadena de la secuencia espaciadora del operador de *repA*, *opsp* 5'CATTGACTTGT/5'ACAAGTCAATG (secuencia que contacta con WH1 en el operador), que

actúa como ligando inductor. La unión de WH1 al ADN es de baja afinidad por lo que debe de ser transitoria (Giraldo y col., 1998; Díaz-López y col., 2006), de hecho, el ADN no es un componente final de los amiloides maduros (Giraldo, 2007). Esto sugiere que la unión electroestática de secuencias específicas de ADN y WH1 dirige el ensamblaje ordenado de la proteína en fibras amiloides, actuando pues el ácido nucleico como catalizador de la amiloidogénesis bajo condiciones cuasi-fisiológicas. El dominio WH1(WT) también es capaz de ensamblarse en amiloides (forma agregados que unen rojo Congo, indicando que posee una estructura enriquecida en láminas- $\beta$ ) pero en forma de nano-esferas y no como fibras convencionales.

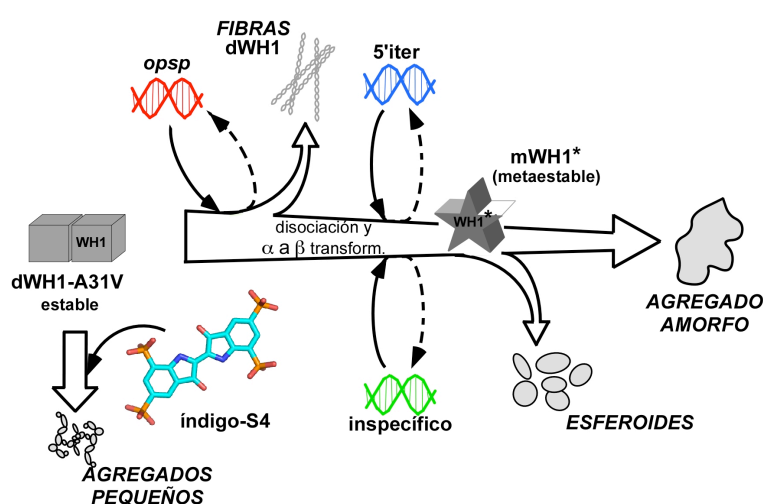


**Figura 10.** Modelo de los cambios conformacionales experimentados por WH1(A31V) en la amiloidogénesis. Los dímeros de RepA-WH1 (dWH1) son estables y solubles. Éstos sufren un cambio conformacional cuando se unen transitoriamente (aunque específicamente) al ligando ADN, resultando en un monómero metaestable con tendencia a agregar (mWH1). La estructura de WH que no cambia significativamente se representa en azul turquesa, mientras que los segmentos que sufren el cambio conformacional se muestran en azul oscuro. El péptido amiloidogénico (localizado en el extremo C-terminal de la hélice- $\alpha 2$  y el lazo adyacente) está coloreado en rojo, con el residuo val31 representado como esferas. Se muestra una la posible vía de exposición de la región amiloidogénica a través de tres movimientos (flechas discontinuas en gris), que provocarían que esos residuos que normalmente se encuentran ocultos por la región N-terminal del WH2, queden expuestos (línea discontinua) al solvente y listos para ensamblarse en una lámina- $\beta$  cruzada amiloide.

La búsqueda, mediante modelado *in silico*, de moléculas de pequeño tamaño que compitieran con el ADN por su unión a la proteína RepA permitió encontrar un derivado tetrasulfonado del colorante índigo (S4) que era un inhibidor de la amiloidosis (Gasset-Rosa y col., 2008b). La caracterización termodinámica de la interacción con el índigo S4 mostró que existe un sitio de unión principal en WH1, al que se une con gran afinidad ( $K_d = 0.23 \mu M$ ) (involucrando interacciones electrostáticas con Arg78, 81, 91 y 93). La inhibición de la unión de RepA-WH1 a la secuencia del operador *opsp* mediada por S4, conlleva la abolición del ensamblaje fibrilar,

constituyendo una prueba de concepto de que el ADN es un inductor alostérico de la amiloidogénesis. Este fue el primer caso de inhibición de la amiloidosis de una proteína utilizando una molécula que interfiere con la unión alostérica de un efector, en lugar de tener directamente como diana la lámina- $\beta$  cruzada.

Se propone un escenario cinético para la amiloidosis de RepA-WH1 dirigido por el ADN (**Figura 11**), de modo que el grado de la transformación conformacional promovida por el ADN se correlaciona inversamente con el orden de la estructura resultante: una transición  $\alpha$ - $\beta$  eficiente y rápida (secuencia de iterón como efector) da como resultado la agregación amorfa de la proteína, mientras que una transformación más lenta (*opsp*) promueve su deposición ordenada como fibras amiloides (Giraldo y col., 2011).



**Figura 11.** Esquema de la ruta propuesta para la amiloidosis de RepA-WH1(A31V). Se muestran las distintas remodelaciones que puede sufrir el dominio WH1-A31V al unirse a secuencias de ADN diferentes: la secuencia espaciadora del operador (*opsp*, en rojo), la secuencia 5' del iterón (en azul) y una secuencia inespecífica (verde). Éstas dan lugar a distintos tipos de ensamblajes en RepA-WH1(A31V), generando fibras ordenadas, estructuras esferoidales o agregados amorfos, respectivamente (Giraldo, 2007). La unión de una molécula de indigo (S4) al dímero WH1(A31V) compite con el ADN, produciéndose entonces la inhibición de la amiloidogénesis y dando lugar a pequeños agregados amorfos. La magnitud del cambio conformacional ejercido por una secuencia de ADN se correlaciona inversamente con el orden de la estructura resultante. Figura tomada de Gasset-Rosa y col. (2008).

Teniendo en cuenta los precedentes descritos antes, en esta Tesis Doctoral, se ha querido profundizar en el estudio *in vivo* de las bases moleculares del primer amiloide bacteriano sintético descrito hasta la fecha, RepA-WH1. Se ha desarrollado un sistema mínimo y sencillo en bacterias (*E. coli*), de modo que pueda servir de sistema modelo para el estudio de la amiloidosis. Asimismo, también se ha explorado qué factores celulares están implicados en este proceso y por último se ha estudiado, utilizando como base quimeras con el prión de levaduras [*PSI*<sup>+</sup>], el potencial priónico de la secuencia amiloidogénica de RepA-WH1(A31V).



---

## II. OBJETIVOS

---

Las bases moleculares de la agregación de las proteínas amiloides son similares en todos los organismos, sean provenientes de microorganismos procariotas, hongos o metazoos. Muchas de estas proteínas poseen naturaleza priónica y son agentes causantes de enfermedades fatales (neurodegenerativas o sistémicas), cuyos mecanismos quedan todavía por esclarecer como previo paso hacia posibles terapias. Considerando estos presupuestos, el estudio de la amiloidosis de RepA-WH1, una proteína iniciadora de la replicación plasmídica bacteriana, ofrece un modelo sintético potente para abordar en un sistema bacteriano simple los mecanismos responsables de las proteinopatías amiloides.

Por ello, en esta Tesis se han propuesto una serie de objetivos dirigidos tanto a profundizar en la caracterización de la amiloidosis de RepA-WH1 *in vivo*, como a conocer qué factores celulares están involucrados en este proceso. De esta forma, se definieron los siguientes objetivos:

- **Objetivo 1:** Estudio del potencial prionoide del dominio WH1 de RepA en *E. coli*.
- **Objetivo 2:** Identificar posibles cofactores implicados en la amiloidogénesis *in vivo*, a este nivel se han estudiado dos factores:
  - Ácidos nucleicos.
  - Chaperonas: Hsp70 y Hsp104.
- **Objetivo 3:** Caracterización de la dinámica de agregación y propagación de RepA-WH1 *in vivo* mediante técnicas de microfluídica.
- **Objetivo 4:** Estudio de la amiloidosis de RepA-WH1 en levaduras a través de priones quimera Sup35\_RepA-WH1.

---

### **III. MATERIALES**

---

## 1. CÉLULAS BACTERIANAS Y DE LEVADURAS

### 1.1. Bacterias

En esta Tesis se han empleado las estirpes JM109 (Yanisch-Perron y col., 1985) y *Fusion Blue* (Clontech) para la clonación de genes bacterianos y de levaduras (**Tabla 2**). Éstas son deficientes en recombinación homologa (*recA*<sup>-</sup>), lo que favorece la estabilidad de secuencias repetidas. La mayor parte de los experimentos fenotípicos se realizaron en MC4100 (Ferenci y col., 2009), estirpe K12 de *E. coli* de características silvestres, y sus derivados mutantes en chaperonas JGT20 (*dnak756*), JGT3 ( $\Delta$ *clpB*) y JGT32 (*dnak756*,  $\Delta$ *clpB*). Por otro lado, también se ha empleado una variante de la estirpe DH5 $\alpha$  (Grant y col., 1990) que porta la proteína iniciadora de la replicación  $\lambda$ pir integrada en su cromosoma y que se ha utilizado como hospedador de un plásmido  $\Delta$ pir, pR6K (**Tabla 4**). La estirpe MG1655 (Blattner y col., 1997) ha sido empleada en experimentos de microfluídica ya que es una cepa silvestre de *E. coli* de manejo habitual de laboratorio pero poco alterada genéticamente, adecuada pues para los estudios fisiológicos.

Nombre	Genotipo	Ensayo	Referencia
JM109	<i>endA1 hsdR17 (r<sub>k12</sub><sup>-</sup>m<sub>k12</sub><sup>+</sup>) supE44 th-1 recA gyrA96 A [lac-proAB] relA1 (F<sup>-</sup> traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> ZΔM15)λ<sup>-</sup></i>	Clonación	Yanisch-Perron y col. 1985
Fusion Blue	<i>endA1 hsdR17 (r<sub>k12</sub><sup>-</sup>m<sub>k12</sub><sup>+</sup>) supE44 th-1 recA gyrA96, relA1 lacF' [proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup> ZΔM15::Tn10(tet<sup>R</sup>)]</i>	Clonación	Clontech
DH5α-λpir	<i>F<sup>-</sup> endA1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44 thi-1 λ<sup>+</sup> recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U169 80dlacZΔM15</i>	Clonación R6K	Grant y col. 1990
MC4100	<i>araD139 D(argF-lac)U169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	Amiloide <i>in vivo</i> / Chaperonas	Ferenci y col. 2009
JGT20	MC4100 <i>dnaK756 thr::Tn10</i>	Chaperonas	Thomas y col. 1998
JGT3	MC4100 <i>ΔclpB::kan</i>	Chaperonas	Thomas y col. 1998
JGT32	MC4100 <i>dnaK756 thr::Tn10 ΔclpB::kan</i>	Chaperonas	Thomas y col. 1998
MG1655	F- lambda- ilvG- rfb-50 rph-1	Inserción en cromosoma	Blattner y col. 1997
MG1655::A31V	MG1655 <i>WH1(A31V)-mCherry Tc<sup>R</sup></i>	Microfluídica	Este trabajo
MG1655::ΔN37	MG1655 <i>WH1(DN37)-mCherry Tc<sup>R</sup></i>	Microfluídica	Este trabajo
MG1655::A31V-YFP	MG1655 <i>WH1(A31V)-mCherry Tc<sup>R</sup> YFP Cm<sup>R</sup></i>	Microfluídica	Este trabajo
MG1655::ΔN37-YFP	MG1655 <i>WH1(DN37)-mCherry Tc<sup>R</sup> YFP Cm<sup>R</sup></i>	Microfluídica	Este trabajo
MG1655::A31V-IbpA	MG1655 <i>WH1(A31V)-mCherry Tc<sup>R</sup> IbpA Cm<sup>R</sup></i>	Microfluídica	Este trabajo

**Tabla 2.** Estirpes de *E. coli* empleadas en este trabajo.

## 1.2. Levaduras

Las cepas de la levadura *S. cerevisiae* empleadas para la realización de esta Tesis están descritas a continuación (**Tabla 3**):

Nombre	Genotipo	Plásmido	Ensayo	Referencia
74D-694	<i>MAT<math>\alpha</math>, sup35::LoxP, ade1-14<sub>UGA</sub>, his-<math>\Delta</math>200 trp1-2889, ura3-52, leu2-3,112 [PSI+][PIN+]</i>	pYK810	Mantenimiento [PSI <sup>+</sup> ]	Von der Haar y col., 2007
BSC783/4a	<i>MAT<math>\alpha</math>, ade2-1UAA, leu2-3,112, ura3-1, his3-11, 15, SUQ5 [PSI+]</i>	-	Sobreexpresión de proteínas	Parham y col., 2001
74D $\Delta$ NM	<i>MAT<math>\alpha</math>, <math>\Delta</math>NM URA3::pNMG, ade1-14<sub>UGA</sub>, his-<math>\Delta</math>200 trp1-2889, ura3-52, leu2-3,112[psi-][PIN+]</i>	-	Microscopía de fluorescencia	Chernoff y col., 1995
MW123	<i>MAT<math>\alpha</math>-leu2, <math>\Delta</math>trp1, ura3, his3, lys2 (ssa1::HIS3) (ssa2::LEU2)</i>	-	Microscopía de fluorescencia	Werner-Washburne y col., 1987

**Tabla 3.** Estirpes de *S. cerevisiae* empleadas en este trabajo.

## 2. PLÁSMIDOS

### 2.1. Bacterias

Los plásmidos empleados en los ensayos referentes a *E.coli* se agrupan en la siguiente tabla (**Tabla 4**). En ella se indica el nombre, marcador de selección, ensayo en el que han sido utilizados y procedencia de los mismos.

Nombre	Marcador	Características	Referencia
pWH1(A31V)	Amp <sup>R</sup>	copias↑, gen WH1(A31V)	Giraldo, 2007
pWH1(A31V)+(opsp) <sub>18</sub>	Amp <sup>R</sup>	+18 copias opsp	Este trabajo
pWH1(A31V)-mCherry+(opsp) <sub>18</sub>	Amp <sup>R</sup>	Fusión WH1(A31V)-mCherry	Este trabajo
pWH1(WT)	Amp <sup>R</sup>	copias↑, gen WH1(WT)	Giraldo, 2007
pWH1(WT)+(opsp) <sub>18</sub>	Amp <sup>R</sup>	+18 copias opsp	Este trabajo
pWH1(WT)-mCherry+(opsp) <sub>18</sub>	Amp <sup>R</sup>	Fusión WH1(WT)-mCherry	Este trabajo
pRSETb-mCherry	Amp <sup>R</sup>	Proteína RFP: mCherry	Shaner y col., 2010
pET11a	Amp	Clonaje de <i>LacI</i> <sup>q</sup>	Novagen
pRIL	Cm <sup>R</sup>	Represor <i>LacI</i> <sup>q</sup>	Stratagene
pSEVA121	Amp <sup>R</sup>	copias↓, parental de la serie pRK2	Lab.V. de lorenzo
pRK2-WH1(A31V)-mCherry ( <i>lacI</i> )	Amp <sup>R</sup>	WH1(A31V)-mCherry, <i>LacI</i> <sup>q</sup>	Este trabajo
pRK2-WH1(A31V)-mCherry (opsp+ <i>lacI</i> )	Amp <sup>R</sup>	+18 copias opsp	Este trabajo
pRG-recA-NHis(ΔN37C133)	Amp <sup>R</sup>	copias↑, gen WH1(ΔN37)	Giraldo y col., 1998
pRK2-WH1(ΔN37)-mCherry ( <i>lacI</i> )	Amp <sup>R</sup>	copias↓, WH1(ΔN37)-mCherry, <i>LacI</i> <sup>q</sup>	Molina, lab. Giraldo
pRG His6-ORC4	Amp <sup>R</sup>	Tag de 6 Histidinas	Giraldo y col., 2001
pKJE7	Cm <sup>R</sup>	Parental de la serie p15A	Takara
p15A-dnaK	Cm <sup>R</sup>	Gen <i>dnaK</i>	Este trabajo
p15A-clpB	Cm <sup>R</sup>	Gen <i>clpB</i>	Este trabajo
pSEVA511	Tc <sup>R</sup>	Parental pR6K	Lab. V. de lorenzo
pR6K-WH1(A31V)-mCherry ( <i>lacI</i> )	Tc <sup>R</sup>	WH1(A31V)-mCherry, <i>LacI</i> <sup>q</sup>	Este trabajo
pR6K-WH1(ΔN37)-mCherry ( <i>lacI</i> )	Tc <sup>R</sup>	WH1(DN37)-mCherry, <i>LacI</i> <sup>q</sup>	Este trabajo

**Tabla 4.** Plásmidos utilizados en este trabajo para los experimentos en *E.coli*.

## 2.2. Levaduras

Los plásmidos empleados para los ensayos de la sección de levaduras se recogen en la siguiente tabla (**Tabla 5**).

	Nombre	Marcador	Característica	Estirpe transformada	Referencia
pUCK1620	SUP35	<i>HIS3</i>	Copia completa <i>SUP35</i>	74D-694	Parham y col., 2001
	R5	<i>HIS3</i>	Delección de repetición R6 <i>SUP35</i>	74D-694	Este trabajo
	R5+WH1-R1	<i>HIS3</i>	Sustitución de R6 <i>SUP35</i> por <i>WH1-amilo</i>	74D-694	Este trabajo
	R5+WH1-R2	<i>HIS3</i>	Sustitución de R6 <i>SUP35</i> por 2 <i>WH1-amilo</i>	74D-694	Este trabajo
	R0	<i>HIS3</i>	Eliminación de repeticiones <i>SUP35</i>	74D-694	Este trabajo
	R0+WH1-R1	<i>HIS3</i>	RO + 1 repetición de <i>WH1-amilo</i>	74D-694	Este trabajo
	R0+WH1-R2	<i>HIS3</i>	RO + 2 repeticiones de <i>WH1-amilo</i>	74D-694	Este trabajo
	R0+WH1-R3	<i>HIS3</i>	RO + 3 repeticiones de <i>WH1-amilo</i>	74D-694	Este trabajo
	R0+WH1-R4	<i>HIS3</i>	RO + 4 repeticiones de <i>WH1-amilo</i>	74D-694	Este trabajo
	R0+WH1-R5	<i>HIS3</i>	RO + 5 repeticiones de <i>WH1-amilo</i>	74D-694	Este trabajo
pYef2	pYEF2	<i>URA3</i>	2 $\mu$ ori, promotor GAC	E.coli	Cullin y col., 1994
	SUP35	<i>URA3</i>	Copia completa <i>SUP35</i>	BSC783/4a	Este trabajo
	R5	<i>URA3</i>	Delección de repetición R6 <i>SUP35</i>	BSC783/4a	Este trabajo
	R5+WH1-R1	<i>URA3</i>	Sustitución de R6 por 1 <i>WH1-amilo</i>	BSC783/4a	Este trabajo
	R5+WH1-R2	<i>URA3</i>	Sustitución de R6 por 2 <i>WH1-amilo</i>	BSC783/4a	Este trabajo
	R0	<i>URA3</i>	Eliminación repeticiones de <i>SUP35</i>	BSC783/4a	Este trabajo
	R0+WH1-R1	<i>URA3</i>	RO + 1 repetición de <i>WH1-amilo</i>	BSC783/4a	Este trabajo
	R0+WH1-R2	<i>URA3</i>	RO + 2 repeticiones de <i>WH1-amilo</i>	BSC783/4a	Este trabajo
	R0+WH1-R3	<i>URA3</i>	RO + 3 repeticiones de <i>WH1-amilo</i>	BSC783/4a	Este trabajo
	R0+WH1-R4	<i>URA3</i>	RO + 4 repeticiones de <i>WH1-amilo</i>	BSC783/4a	Este trabajo
	R0+WH1-R5	<i>URA3</i>	RO + 5 repeticiones de <i>WH1-amilo</i>	BSC783/4a	Este trabajo



	Nombre	Marcador	Características	Estirpe transformada	Referencia
pCM182	SUP35	TRP1	Herramienta de clonación	<i>E.coli</i>	Gari y col., 1997
	NM-mCherry	TRP1	NM de SUP35-mCherry (NM)	74 ΔNM/MW123	Este trabajo
	R0	TRP1	NM_sin repeticiones	74 ΔNM/MW123	Este trabajo
	R5+WH1-R2	TRP1	NM_R6 por 2 repeticiones de WH1-amilo	74 ΔNM/MW123	Este trabajo
	R0+WH1-R2	TRP1	NM_R0 + 2 repeticiones de WH1-amilo	74 ΔNM/MW123	Este trabajo
	R0+WH1-R4	TRP1	NM_R0 + 4 repeticiones de WH1-amilo	74 ΔNM/MW123	Este trabajo
	PYK810	URA3	Copia completa de SUP35	74D-694	Kikuchi y col., 1988

**Tabla 5.** Plásmidos utilizados en este trabajo en la sección sobre *S. cerevisiae*.

### 3. MEDIOS DE CULTIVO

#### 3.1. Bacterias

LBT: 10 g/l bactotripton, 5g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl y 2 g/l timina (pH 7.4). Para la elaboración del medio sólido se suplementa con agar bacteriológico al 2% (peso/volumen).

SOC: 2% bactotripton, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub> y 20 mM glucosa.

M9: 0.1M CaCl<sub>2</sub>, 0.5M MgSO<sub>4</sub>, 12 g/l Sales M9 5X, 2 g/l CAA y 0.4% glucosa. Este medio se esteriliza por filtración.

#### 3.2. Levaduras

YPD: 2% bactopectona, 1% extracto de levadura y 2% glucosa. Para la elaboración del medio sólido se suplementa con agar bacteriológico al 2%.

¼ YPD: 2% bactopectona, 0.25% extracto de levadura y 4% glucosa.

YPD-Rafinosa: 2% bactopectona, 1% extracto de levadura, 2% rafinosa y 0.1% glucosa.

Medio sintético sin: histidina (SD-His), o adenina (SD-Ade), o uracilo (SD-Ura) o triptófano (SD-Trp): 0.67% Difcoyeast Nitrogen, 2% glucosa, 2% agar bacteriológico y drop-out sintético de levaduras sin histidina (1.92 gr/l), o sin adenina (0.78 gr/l), o sin uracilo (1.92 gr/l), o sin triptófano (1.92 gr/l).

SD-Ura más 5-FOA más uracilo: 0.67% *Difcoyeast Nitrogen*, 2% glucosa, 2% agar bacteriológico, 0.2% *drop-out* sintético menos uracilo (1.92 gr/l), 0.1% 5-FOA (ácido 5-fluoro-orótico monohidratado) y 5 mg/l uracilo.

SD-His o SD-Trp o SD-Ura más sorbitol: 0.67% *Difcoyeast Nitrogen*, 2% glucosa, 2% agar bacteriológico y *drop-out* sintético de levaduras SD-His (1,92 gr/l), o SD-Ura (1,92 gr/l), o SD-Trp (1,92 gr/l) y 1M sorbitol.

## 4. REACTIVOS

### 4.1. Enzimas

#### 4.1.1. Enzimas de restricción

Las enzimas empleadas para la realización de este trabajo fueron adquiridas en las casas comerciales *New England Biolabs*, *Roche Applied Science* y *Fermentas*.

#### 4.1.2. Polimerasas

La enzima empleada para la amplificación del ADN mediante PCR fue la Pfu ADN polimerasa de *Promega*; para la mutagénesis dirigida se empleó la enzima Pfu turbo ADN polimerasa de *Stratagene*. También se utilizó el *kit In-Fusion Dry-Down PCR cloning* de *Clontech*.

#### 4.1.3. ADN ligasa

La ligasa empleada para la clonación de fragmentos de ADN fue la T4 ADN ligasa de *Promega* o de *Roche*.

#### 4.1.4. Otras enzimas

Se empleó el fragmento Klenow de la ADN Polimerasa I, la RNasa A, la proteinasa K y la fosfatasa alcalina antártica de la casa comercial *New England Biolabs*. La T4 polinucleótido Kinasa de la casa comercial *USB* y la lisozima de *Sigma-Aldrich*.

## 4.2. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios monoclonales utilizados fueron: anti-HA (clon 12CA5) de *Roche*, anti-His (clon-His1) de *Sigma*, anti-DnaK (clon 8E2/2) de *Enzo Life Sciences*. Los anticuerpos primarios policlonales: anti-ClpB, cedido por el laboratorio de M. Zolkiewski, y el anti suero de conejo anti-RepA-WH1(A31V) (María Moreno, de nuestro laboratorio, y el servicio del animalario del CIB-CSIC). Los secundarios fueron, anticuerpos anti-ratón y anti-conejo conjugados a la peroxidasa de rábano (HRP) de *GE Healthcare*, anti-ratón y anti-conejo conjugado con partículas de oro de 10 nm (*Sigma*) y, por último, anti-ratón y anti-conejo conjugado con Alexa 488 de *Molecular Probes*.

### 4.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos (**Tabla 5 y 6**) fueron sintetizados por el Servicio de Química de Proteínas del CIB. También se utilizó el servicio de la empresa *ATG:biosynthetics* para la síntesis de un fragmento de 300 pares de bases (pb) con 3 repeticiones de la secuencia amiloidogénica RepA-WH1(A31V) (**Tabla 6**).

### 4.4. Secuenciación de ADN

La secuenciación se llevó a cabo por parte de la empresa *Secugen*, para ello se utilizaron oligonucleótidos cebadores universales o diseñados en nuestro laboratorio.

### 4.5. Purificación de fragmentos de ADN

La purificación de ADN, extraído de gel de agarosa o de reacciones enzimáticas, se realizó utilizando los reactivos de los productos *FavorPrep Gel Purification Kit (Favorgen)* y *Agarose Gelextract mini Kit (5 Prime)*.

### 4.6. Proteínas

Para el lisado de células se utilizó la matriz de vidrio *glass beads* (1.0 mm  $\phi$ , *Lysing Matrix C*) de *MP Biomedicals*.

Se utilizaron los filtros y las membranas *Sequi-Blot* de PVDF de *BioRad* para la transferencia de proteínas. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron el *Broad Range* (2-212 kDa) de *New England Biolabs* y el *Precision Blue Protein Standards* de *BioRad*.

Se empleó para la detección de proteínas: el *SilverQuest Silver Staining Kit* de *Invitrogen* para la detección por tinción con plata y el *kit ECL Plus* de *GE Healthcare* para la inmunodetección. Para el revelado de las autorradiografías se han utilizado las películas *AGFA Curix RP2*.

### 4.7. Microscopia

Para la fijación de las muestras se utilizó el *Vectashield* de *Vector Laboratories*, para la MET se utilizaron las rejillas de *Formvar* y la Miricetina de *Sigma-Aldrich*.

### 4.8. Otros

Cóctel de inhibidores de proteasas de *Roche*; FOA de la casa *Apollo scientific*.

---

## **IV. MÉTODOS**

---

## MÉTODOS RELATIVOS A *E. coli*

### 1. MANIPULACIÓN DEL ADN

#### 1.1. Células competentes y transformación de *E. coli*

##### 1.1.1. Choque térmico

Se prepararon células competentes de las estirpes JM109 y *Fusion Blue* (**Tabla 2**). Se utilizó el método de cloruro de rubio (Hanahan, 1983), si se deseaba almacenar a -70°C células competentes durante largo tiempo. Si se requería emplearlas frescas, para uso en el mismo día o al siguiente, se prepararon utilizando el método del CaCl<sub>2</sub> (Sambrook y Pollack, 1974). En ambos casos, la transformación se llevó a cabo por choque térmico (Sambrook y Pollack, 1974).

##### 1.1.2. Electroporación

Para la preparación de células electrocompetentes se incubó la estirpe de *E. coli* DH5α o *Fusion Blue* (**Tabla 1**) en medio LBT, inoculada a partir de un cultivo fresco, en un volumen de 500 ml que se creció hasta una DO<sub>600</sub> de 0.5-0.7. Las células se incubaron en hielo durante 20 minutos y se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se realizaron sucesivos lavados con volúmenes decrecientes (500 ml, 250 ml, 20 ml) de glicerol al 10%. Finalmente se resuspendieron en 1 ml de glicerol al 10% y se hicieron alícuotas de 40 µl.

A cada alícuota de células electrocompetentes frescas se añadió 1 µl de la muestra del ADN plasmídico y se incubó durante 5 minutos en hielo. Después se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación (*BioRad*) de 0,2 cm de distancia entre electrodos y en el *MicroPulser* (*BioRad*) se programó el micropulso “Ec2” (2,5kV); se realizó el choque eléctrico (la constante de tiempo ha de rondar los 5 milisegundos). Posteriormente se le añadió 1 ml de medio SOC y se incubó durante una hora a 37°C, sembrándose a continuación en medio selectivo.

### 1.2. Extracción de ADN

#### 1.2.1. ADN plasmídico

La purificación del ADN plasmídico a pequeña escala se realizó por el método de lisis alcalina utilizando el *kit High pure plasmid isolation* (*Roche*).

#### 1.2.2. ADN genómico

De un cultivo incubado durante toda la noche de la estirpe MG1655 o MC4100 (**Tabla 2**) se centrifugaron 2 ml y se eliminó el sobrenadante, el sedimento resultante se resuspendió en 300 µl de 50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA y 20% sacarosa. Posteriormente se añadió una solución de lisozima (5 g/l) y se incubó durante 20 minutos a 4°C, después se le añadió 12 µl de una solución de proteinasa K (5 g/l) más 3 µl de RNasa A (5 g/l). Las muestras se incubaron

durante una hora y media a 37°C. Después se añadieron 30 µl de SDS al 10% y se incubó durante 5 minutos a 4°C. Se añadieron 300 µl de fenol saturado en TE y se agitó vigorosamente durante 15 segundos, tras lo cual se centrifugó 10 minutos a máxima velocidad y se recuperó la fase acuosa. Este último paso se repitió y se precipitó el ADN con dos volúmenes de etanol al 100%. Finalmente, se centrifugó durante 10 minutos a máxima velocidad y el sedimento se resuspendió en agua.

### 1.3. Construcción de vectores de expresión

A continuación (**Tabla 6**) se muestran los oligonucleótidos utilizados para la confección de los vectores empleados en los ensayos en *E. coli*. Éstos se verificaron mediante restricción enzimática y secuenciación automática del ADN.

Nombre	Oligonucleótidos (5'-3')	Construcción
opsp-A	CAATGACAAGTCAATGACAAGT	pWH1(WT/A31V)+(opsp) <sub>18</sub>
opsp-B	TGTTTCAGTTACTGTTTCAGTTAC	
mch-BspEI	AGCTCAAGGGAAGCTCTGGTTCAT <b>TCCGGA</b> ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	pWH1(WT/A31V)-mcherry+(opsp) <sub>18</sub>
mch-HindIII	AGTCGACCTGCAGGCAGGCATGCA <b>AAGCTT</b> CACTTGTACAGCTCGTCCATGC	
Ptac-SpeI	GCT <b>ACTAGT</b> TGACAATTAATCATCGGCTCG	pRK2WH1(WT/A31V)+(opsp) <sub>18</sub>
MCS-EcoRI	AGT <b>GAATTC</b> GAGCTCGGTAC	
<i>lacI</i> -KpnI	GCTC <b>GGTACCT</b> CGATCCTCTACGCCGGAC	pRK2WH1-A31V(opsp+ <i>lacI</i> )
<i>lacI</i> -EcoRI	CGAG <b>GAATTC</b> TCATGCCCCGCGCCAC	
DnaK-SacII	CTCG <b>CCGCGGG</b> GAGCATGGGTAAAATAATTGGTATCG	Amplificación <i>dnaK</i>
DnaK-XmaI	GAG <b>CCCGGG</b> TTATTTTTTGTCTTTGACTTC	
ClpB-SacII	CTCG <b>CCGCGGG</b> GAGCATGCGTCTGGATCGTCTTACT3'	Amplificación <i>clpB</i>
ClpB-XmaI	GAG <b>CCCGGG</b> TTACTGGACGGCGACAATCCGG	
6HIs-NdeI	CTCG <b>CATATG</b> GGCAGCAGCCATCATCAT	p15A- <i>dnaK</i>
DnaK(II)-XmaI	GAG <b>CCCGGG</b> TTATTTTTTGTCTTTGACTTC	
6HIs-NdeI	CTCG <b>CATATG</b> GGCAGCAGCCATCATCAT	p15A- <i>clpB</i>
ClpB(II)-XmaI	GAG <b>CCCGGG</b> TTACTGGACGGCGACAATCCG	
Para-NdeI	CTCG <b>CATATG</b> CTAAACGTCTCCACAATCCATAGCCA	Amplificación de pKJE7 <i>Para, araC</i> , Cm, replicón p15A
Para-XmaI	GAG <b>CCCGGG</b> TTTCTGCTTTCGTAATAATTC	
<i>lacI</i> -EcoRI	CGAG <b>GAATTC</b> TCATGCCCCGCGCCAC	Comprobación de inserción de <i>lacI<sup>q</sup></i> en el cromosoma
3'mCherry	GGACTACACCATCGTGGAAC	
Ptac-SpeI	GCT <b>ACTAGT</b> TGACAATTAATCATCGGCTCG	Comprobación inserción de WH1(A31V/ΔN37) en cromosoma
mch-NotI	CGAG <b>GCGGCCGCT</b> CACTTGTACAGCTCGTCCA	

**Tabla 6.** Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

### 1.3.1. Construcción de pWH1(A31V/WT)-mCherry -/+ (opsp)<sub>18</sub>

Los oligonucleótidos conteniendo la secuencia *opsp*-dsDNA, *opsp*-A y *opsp*-B (Tabla 6), se fosforilaron y se ligaron para generar concatémoros como producto final. Después de rellenar los extremos con el enzima Klenow ADN polimersa, se clonó en el plásmido pRGrectac-NHis-WH1 (A31V/WT), denominado concisamente pWH1(A31V/WT) (Tabla 4) (Giraldo, 2007), previamente linearizado con SmaI.

Por otro lado, la variante monomérica mCherry de la proteína RFP, fue amplificada por PCR a partir del plásmido pRSETb-mCherry, cedido por Roger Y. Tsien (Shaner y col., 2004) (**Tabla 4**) utilizando los oligonucleótidos mch-BspEI y mch-HindIII (**Tabla 6**). La PCR se clonó inmediatamente después del gen *repA-WH1*, formando una fusión traduccional sobre los plásmidos pWH1(A31V/WT)+(opsp)18 y pWH1(A31V/WT): éstos se linearizaron por restricción con HindIII y en ellos se recombinó el fragmento resultante de la PCR utilizando el *kit In-Fusion Dry-Down PCR cloning*. Entre ambas proteínas fusionadas se incluyó un segmento codificando un espaciador flexible: (Gly-Ser-Ser)<sub>2</sub>-Gly.

### 1.3.2. Construcción de pRK2-WH1(A31V)-mCherry (opsp+lacI)

A partir del vector de expresión pWH1(A31V)-mRFP+(opsp)18 se amplificó por PCR el módulo *Ptac-RepA-WH1(A31V)-mRFP(opsp)18* (Giraldo, 2007) utilizando los oligonucleótidos *Ptac-SpeI* y *MCS-EcoRI* (**Tabla 6**). Posteriormente, el producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción *SpeI* y *EcoRI* y el fragmento resultante se introdujo en el plásmido de bajo número de copias pSEVA121 (minireplicón RK2) (**Tabla 6**), previamente digerido por *SpeI* y *EcoRI*. Sobre el plásmido resultante se introdujo, por digestión *KpnI* y *EcoRI*, el gen *lacI<sup>q</sup>* amplificado por PCR, a partir del plásmido pET11a (*Novagen*) a través de los oligonucleótidos *lacI-KpnI* y *lacI-EcoRI* (**Tabla 6**).

### 1.3.3. p15A-dnaK/clpB

Las secuencias codificadoras para DnaK y ClpB se amplificaron por PCR a partir del ADN genómico de MC4100 (**Tabla 2**), a través de los oligonucleótidos *DnaK-SacII* y *DnaK-XmaI* (para *dnaK*) y *ClpB-SacII* y *ClpB-XmaI* (para *clpB*) (**Tabla 6**). El producto de PCR resultante se digirió con las enzimas de restricción *SacII* y *XmaI* y se insertó en el plásmido pRG-His6-ORC4 (**Tabla 4**) previamente digerido por *SacII* y *XmaI*. De esta manera se fusiona una secuencia que codifica para una cola de 6 histidinas justo antes de cada uno de los genes *dnaK* y *clpB*. Éstos se amplificaron a su vez por PCR a través de los oligonucleótidos 6His-NdeI y *DnaK(II)-XmaI* por un lado y 6His-NdeI y *ClpB(II)-XmaI* por otro (**Tabla 6**). Los productos de PCR se digirieron con las enzimas de restricción *NdeI* y *XmaI* y se ligaron al módulo que incluye *Para*, el represor *araC*, el gen de resistencia al cloranfenicol y el replicón p15A, generado mediante amplificación por PCR del plásmido pKJE7 (**Tabla 3**) utilizando los oligonucleótidos *Para-NdeI* y *Para-XmaI* (**Tabla 6**).

## 1.4. Inserción de genes en el cromosoma de *E. coli* MG1655

### 1.4.1. Integración de los módulos de expresión WH1(A31V) y WH1(ΔN37)

Se digirieron los plásmidos pRK2-WH1(A31V)-mCherry y pRK2-WH1(ΔN37)-mCherry (**Tabla 3**) (este último construido en nuestro laboratorio por Laura Molina) con las enzimas *SpeI* y



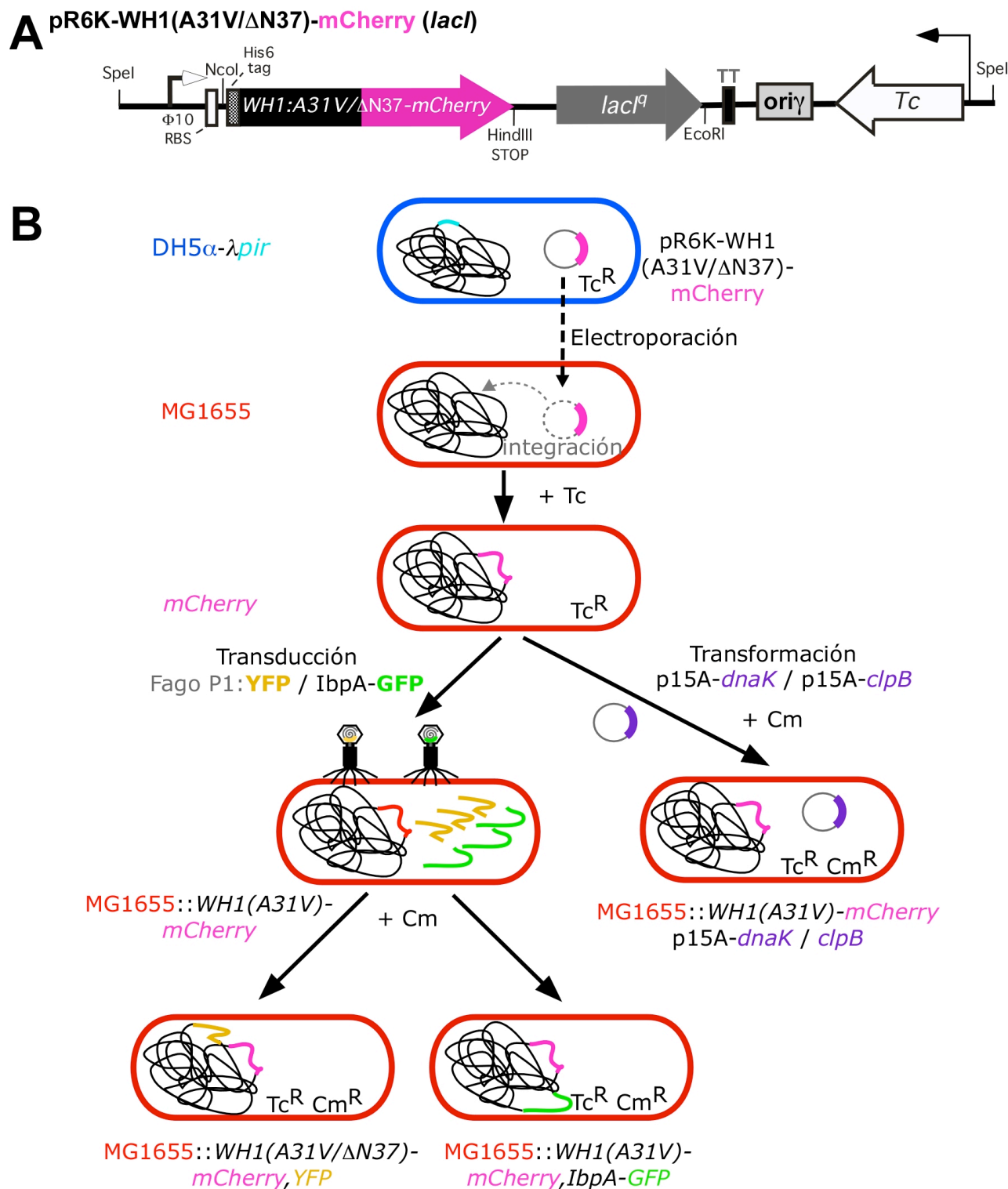
EcoRI. Se extrajo del gel de agarosa el fragmento correspondiente al gen *repA-WH1* y se insertó por ligación en el plásmido pSEVA511 ( $\Delta pir$ , replicón R6K) (**Tabla 4**) digerido por SpeI y EcoRI. La transformación se llevó a cabo en la estirpe DH5 $\alpha$  ( $\lambda pir$ ) mediante electroporación. El plásmido resultante, pR6K-WH1(A31V/ $\Delta$ N37)-mCherry (**Tabla 4**), se electroporó en la estirpe MG1655 (**Tabla 2**) y se seleccionaron los clones que crecieron en medio selectivo con tetraciclina (**Figura 12**).

Se extrajo de los transformantes su ADN genómico y se comprobó por un lado la inserción en el cromosoma de *WH1-mCherry* mediante PCR a través de los oligonucleótidos *Ptac-SpeI* y *mch-NotI* (**Tabla 6**) y por otro, la inserción del gen represor *lacI<sup>q</sup>* mediante los oligonucleótidos *LacI-EcoRI* y 3' mCherry (**Tabla 6**). Finalmente, se analizó la expresión (por inducción con IPTG) de las proteínas fusionadas a los marcadores mCherry por medio de *Western blot* y visualización de los cultivos inducidos al microscopio de fluorescencia.

Una vez comprobada la inserción en el cromosoma, se transformaron los plásmidos p15A-*dnaK* y p15A-*clpB* (**Tabla 5**) en la estirpe MG1655::WH1(A31V)-mCherry (**Figura 12**).

#### 1.4.2. Transducción de los genes *YFP* e *ibpA-GFP*

De un cultivo crecido toda la noche [MG1655::WH1(A31V) o MG1655::WH1( $\Delta$ N37)] se tomaron 100  $\mu$ l y se añadieron 500  $\mu$ l de una solución 30 mM MgSO<sub>4</sub> y 15 mM CaCl<sub>2</sub>, más 500  $\mu$ l de un sobrenadante de cultivo con fago P1(*YFP*) o P1(*ibpA-GFP*). Tanto YFP como IbpA-GFP se encuentran bajo el promotor constitutivo  $\lambda P_R$  (Elowitz y col., 2002) y poseen resistencia a cloranfenicol. La mezcla se incubó a 37°C durante veinte minutos con agitación suave y, posteriormente se centrifugó durante tres minutos y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 1.5 ml de LB con citrato de sodio (20 mM) y se incubó durante una hora a 37°C. A continuación, se centrifugó y se sembró en LB-agar suplementado con tetraciclina y citrato sódico.



**Figura 12.** Ilustración de la estrategia de integración de WH1(A31V/ $\Delta$ N37) (en rojo), YFP (amarillo) e IbpA-GFP (verde) en el cromosoma de MG1655. (A) Esquema del plásmido pR6K-WH1((A31V/ $\Delta$ N37)-mCherry-*lacI*). (B) Procedimiento para la obtención de las estirpes derivadas de MG1655 utilizadas en los ensayos microfluídicos.

## 2. CULTIVOS CELULARES BACTERIANOS

El procedimiento general de cultivo de las células de *E. coli* MC4100, o sus isogénicas JGT20 (*dnaK756*), JGT3 ( $\Delta$ *clpB*) y JGT32 (*dnaK756*,  $\Delta$ *clpB*) (Thomas y Baneyx, 1998) (**Tabla 2**)

consiste en el crecimiento en medio LB suplementado con glucosa (0.1%), junto ampicilina (100 mg/l) o cloranfenicol (30 mg/l) si se requiere. Las bacterias se cultivan a 37°C hasta crecimiento exponencial ( $OD_{600}$  de 0.2), se indujeron con IPTG (0.5 mM) y se continuaron cultivando a 37°C. De estos cultivos se toman alícuotas de 1 ml cada 30 minutos durante 4 horas. Para la doble expresión de WH1 y las chaperonas, los inductores específicos de cada promotor (0.1 mM IPTG y 0.5% L-arabinosa) se añadieron, sucesivamente, en uno u otro orden con un intervalo de 30 minutos.

## 2.1. Observación de las bacterias al microscopio

### A. INSTRUMENTACIÓN EMPLEADA

#### 2.1.1. Microscopios de epifluorescencia

La observación rutinaria de las células bacterianas se llevo a cabo utilizando un equipo de imagen AF6000 LX (Leica), que consta de un microscopio invertido DM16000B, un objetivo de aceite de inmersión HCX PLAN APO (100x/NA 1.40) y una cámara Hamamatsu C9100-02 CCD. Se tomaron imágenes de contraste de fases y se utilizaron los siguientes filtros de excitación y supresión: mCherry (BP 546/12, BP 600/40); DAPI (BP 360/40, BP 470/40); Alexa 488 (BP 480/40, BP 527/30); y BTA-1 (BP 467/37).

Para el estudio del efecto de las chaperonas, se utilizó un microscopio Nikon Eclipse 90i, equipado con un objetivo de inmersión CFI PLAN APO VC 100x (NA 1.40) y una cámara Hamamatsu ORCA-R<sup>2</sup> CCD. Se utilizaron los siguientes filtros de excitación (EX) y de emisión (EM): m-Cherry (EX 543/22, EM 593/40), DAPI (EX 387/11, EM 447/60), Alexa 488 (EX 482/35, EM 536/40). También se tomaron imágenes de constante diferencial interferométrico (DIC).

#### 2.1.2. Microscopio confocal

La microscopía confocal se llevo a cabo utilizando un equipo de imagen Leica TCS-SP2-AOBS, que incluye un microscopio invertido DMIRE2 y con un objetivo HCX PL APO CS 100x (NA 1.40) El *software* suministrado por Leica fue utilizado para la superposición de imágenes de diferentes longitudes de onda, tanto este *software* como el de *Nis-elements AR* (Nikon) se utilizaron para llevar a cabo las cuantificaciones.

#### 2.1.3. Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (MET) fue realizada utilizando un microscopio electrónico JEOL JEM-1230, operado a 100 kV. Las películas fotográficas (Kodak) se digitalizaron utilizando un escáner AGFA Arcus 1200. Alternativamente, las imágenes también fueron capturadas digitalmente con una cámara TVIPS TemCam-F416 CMOS.

## **B. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU VISUALIZACIÓN**

### **2.1.1. Microscopio de fluorescencia**

#### **i. Fijación y montaje de las células**

Para la observación de bacterias fijadas, se centrifugaron 0.5-1.0 ml de cultivo y las células se lavaron con el mismo volumen de tampón PBS (10 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 15 mM KCl pH 7.4). Las bacterias tratadas se centrifugaron de nuevo a 1600 rpm y el sedimento se resuspendió y se fijó con 1 ml de paraformaldehído (PFA) fresco (preparado al 4% en tampón PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación, los sedimentos de células se lavaron dos veces en PBS y finalmente se resuspendieron en el mismo tampón PBS. En algunos experimentos, las células se tiñeron incluyendo 5 mg/ml de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol-2HCl de *Serva*) durante 15 minutos en el proceso de fijación. De la suspensión final se tomaron 10  $\mu$ l que se secaron al aire en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina y se montaron con medio *Vectashield*.

#### **ii. Tinción con BTA-1**

Para la tinción con BTA-1, las células se fijaron en PFA y se lavaron con PBS, como está descrito en el apartado anterior. Posteriormente se resuspendieron en BTA-1 [2-(4'-metilaminofenil) benzotiazol (*Sigma*), 1 mM en etanol], se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se realizó el lavado de las células con PBS. Por último se montaron como se describe en el apartado anterior.

#### **iii. Time-lapse: Estudios con resolución temporal**

Para la microscopía con resolución temporal, se depositaron sobre un portaobjetos 100  $\mu$ l de LB-agar (al 1.5%) con ampicilina que, una vez aireado mediante pipeteo repetido, se recubrió con un cubreobjetos hasta su solidificación. Posteriormente se retiró el cubreobjetos y se añadieron en la superficie de agarosa IPTG (hasta 0.5m M) más 10  $\mu$ l de cultivo y se cubrió con un cubreobjetos. Las muestras se mantuvieron en la cámara termostatzada del microscopio, bajo humedad y temperatura (37°C) controladas. Para todos los experimentos, las imágenes se tomaron a los intervalos de tiempo especificados.

### **2.1.2. Microscopía confocal: Inmunofluorescencia**

Las células se fijaron en PFA fresco al 2% (preparado en tampón PBS conteniendo Triton X-100 al 0.5%) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados con este tampón, los sedimentos se resuspendieron en GTE (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 7.5). Después se tomaron alícuotas de 15  $\mu$ l y se secaron al aire en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina que posteriormente se trataron con lisozima (8 g/l en GTE) durante 5 minutos a temperatura ambiente y se realizaron dos lavados en PBS durante 10 minutos. Finalmente, los

portaobjetos se incubaron con solución bloqueante (PBS, Tween-20 0.05% y BSA al 2%) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Después las muestras se incubaron con un anticuerpo primario monoclonal anti-His (dilución 1:4000 disuelto en solución bloqueante) o un monoclonal de ratón anti-DnaK (dilución 1:1000), o un policlonal de conejo anti-ClpB (dilución 1:5000) (Tek y Zolkiewski, 2002) durante toda la noche a 4°C. Las preparaciones se lavaron 5 veces durante 10 minutos en PBS conteniendo Tween-20 (0.05%) y finalmente se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo (o anti-ratón) conjugado a Alexa 488 (dilución 1:1000 o 1:100 disuelto en solución bloqueante) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad (Tek y Zolkiewski, 2002). Después de 5 lavados en PBS (Tween-20 0.05%), las muestras se secaron al aire y se montaron como se describe previamente (Fijación y montaje de células, II.b.1.i). Por otro lado, se llevaron a cabo en paralelo controles negativos, omitiendo la incubación con el anticuerpo primario.

### 2.1.3. Inmuno-microscopía electrónica de transmisión

Se fijaron los cultivos, en crecimiento exponencial, con PFA (2% en PBS) durante una 1 hora y se realizaron 3 lavados con PBS durante 10 minutos. Una vez embebidos en agarosa al 2%, los bloques resultantes se cortaron en pequeñas piezas y fueron lavados en PBS. A continuación, se deshidrataron a través de series de lavados con etanol (desde 30% hasta etanol absoluto) para ser finalmente perfundidos en resina blanca *London* a 60°C hasta su la solidificación.

El marcaje con inmuno-oro se llevo a cabo en secciones ultrafinas de las células depositadas en las rejillas (sombreadas con níquel). Éstas fueron sucesivamente sumergidas en gotas de: glicina al 20% en PBS durante 15 minutos; PBS que contiene Tween al 0.05% durante 10 minutos; solución bloqueante (PBS más Tween-20 0.05%, BSA 2%) durante 30 minutos; y anticuerpo anti-His (dilución 1:4000 en solución bloqueante) para la inducción simple, o anticuerpo anti-RepA-WH1(A31V) (dilución 1:10) y anti-DnaK (dilución 1:200) o anti-ClpB (dilución 1:5000) para la inducción doble. Las muestras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de tres lavados (10 minutos cada uno) en PBS-Tween-20, las rejillas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo conjugado con partículas de oro coloidal de 10 nm (dilución 1:50 en solución bloqueante), y posteriormente se realizaron tres lavados en PBS (Tween-20) y uno en agua destilada. Las rejillas se secaron al aire y se sombrearon con una solución de acetato de uranilo al 5% durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron con agua bidestilada y fueron secadas al aire antes de su observación al microscopio electrónico. Además, se realizaron controles negativos en los que se eliminó la incubación con el anticuerpo primario.

## 2.2. Análisis bioquímico

### 2.2.1. Cuantificación de WH1(A31V), DnaK y ClpB mediante *Western blot*

Los cultivos de las estirpes MC4100, JGT20 y JGT3 fueron centrifugados tras 1, 2, 3 y 4 horas de inducción.  $1 \times 10^9$  células se resuspendieron en 125  $\mu$ l de tampón de carga de proteínas y se lisaron hirviéndolas durante 10 minutos. Volúmenes equivalentes a una  $DO_{600}$  de 0.01 ( $\approx 2 \times 10^7$  células) se cargaron en un gel de SDS-PAGE (12.5% de poliacrilamida) (Laemmli, 1970) Además se cargaron 0.035  $\mu$ g (0.55 pmol) de la proteína purificada His6-Orc4p (Giraldo y Díaz-Orejas, 2001), utilizada como control estándar en la cuantificación. Posteriormente se realizó el análisis por *Western blot*, según el método adaptado por nuestro laboratorio (Giraldo y Díaz-Orejas, 2001), utilizando como anticuerpo primario monoclonal un anti-His (dilución 1:30000) y como secundario un anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) (dilución 1:10000).

Tras la reacción quimioluminescente (utilizando el reactivo *ECL Plus*, *GE Healthcare*) y posterior autorradiografía de la señal, ésta se digitalizó y se realizó su cuantificación con el software *Quantity One* (v. 4.6.3; *Bio-Rad*). Se relacionó la intensidad de la señal con el número de moléculas en el control Orc4p y a partir de esta relación se calculó el número de moléculas por célula de las proteínas RepA-WH1(A31V), DnaK y ClpB. Los resultados se procesaron y representaron gráficamente utilizando el programa *KaleidaGraph* (v. 3.6.2; *Synergy Software*).

### 2.2.2. Caracterización de los agregados: Electroforesis en geles de agarosa en condiciones semi-desnaturalizantes (SDD-AGE)

Se crecieron las estirpes MC4100, JGT20 o JGT3 en 25 ml de cultivo, tras 2.5 horas de inducción y a una  $DO_{600}$  de 2, se centrifugaron y se resuspendieron en 400  $\mu$ l de solución de lisis (25 mM Tris-HCl pH 6.8, 250 mM, 5 mM NaCl, EDTA, 10% glycerol, suplementado con inhibidor de proteasas) (Bagriantsev y col., 2006). De esta suspensión se transfirió 1/3 de volumen a un tubo que contiene esferas de vidrio (1.0 mm  $\phi$ , *Lysing Matrix C*) y se procedió a la lisis de las células en el homogeneizador *FastPrep-MP* (30 seg, potencia IV, 4 veces a 4°C). Se tomaron 3  $\mu$ l de las muestras y se resuspendieron en 36  $\mu$ l de solución de lisis más 10  $\mu$ l de tampón de carga 4X (TAE 2X, 20% glicerol, 8% Sarcosyl, 0,5 g/l azul de bromofenol, más una píldora de inhibidores de proteasas por cada 10 ml de tampón), las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se cargaron en un gel al 1.5% de agarosa en TAE 1X, 0.1% SDS. La electroforesis se desarrolló a 100V-400 mA durante 7,30 h a 10°C.

Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF en una cubeta *TransferBlot* de *BioRad*. La transferencia se realizó en tampón TAE 1X (0,1% SDS) a 10°C durante 15 horas a 16V-400 mA. La membrana se bloqueó TBST (suplementado al 5% con leche en polvo desnatada) durante toda la noche y se incubó con distintos anticuerpos primarios: anti-

RepA-WH1(A31V) (dilución 1:500), anti-DnaK (1:2500) o anti-ClpB (1:3000) y como secundario, anticuerpo anti-ratón o anti-conejo conjugado con HRP(dilución 1:10000). Finalmente, se detectó la señal por luminescencia química. Se realizaron rehibridaciones para cada anticuerpo primario, desnudando la membrana con 8 M cloruro de guanidina durante 1 minuto.

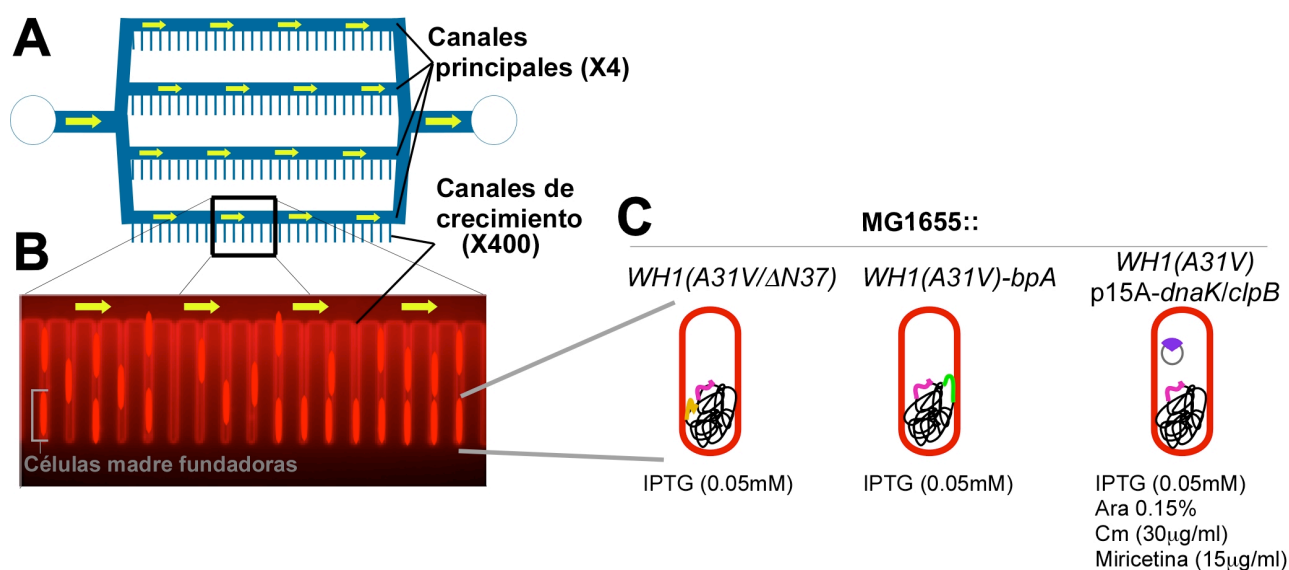
### 3. MICROCHIPS Y OBSERVACIÓN MICROFLUÍDICA

#### 3.1. Fabricación de *chips*

Se utilizaron técnicas estándar de litografía blanda según la metodología descrita por George Whitesides y colaboradores, para crear el molde maestro en dos pasos (la primera capa correspondiente a los canales de crecimiento, y la segunda al canal central) y para fabricar el dispositivo madre de polydimetilsiloxano (PDMS). Las dimensiones de los canales de crecimiento fueron: de anchura, 1.1-1.3  $\mu\text{m}$ ; altura, 1.3-1.5  $\mu\text{m}$ ; y longitud, 25  $\mu\text{m}$ . Dichos canales están conectados al canal principal, cuyas dimensiones eran: 25x100  $\mu\text{m}$  (profundidad y anchura) y 30 mm de largo. Para observar el crecimiento de *E. coli* durante largos periodos, el dispositivo se trató químicamente (Lee y col., 2003), y en el momento de la utilización de la microcélula de flujo, la superficie de los canales se neutralizó con PEG (400) al 20% y posteriormente con medio mínimo (M9), suplementado con PEG al 1.5% para impedir la adhesión de las células a la superficie de PDMS.

#### 3.2. Condiciones de crecimiento de *E. coli* MG1655

El crecimiento de las células se llevó a cabo en medio M9 a 37°C. Tras el crecimiento de la estirpe durante toda la noche (MG1655::A31V-YFP, MG1655:: $\Delta$ N37-YFP, MG1655::A31V-ibpA, MG1655::A31V+p15A-*dnaK* o MG1655::A31V+p15A-*clpB*), al día siguiente 50  $\mu\text{l}$  del cultivo se diluyeron en 20 ml de medio M9 y se dejaron crecer hasta una DO<sub>600</sub> de 0.2. El cultivo se centrifugó y se realizaron dos lavados con M9 (1.5% PEG). El sedimento final se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de M9 (1.5% PEG). Se inyectaron las células en el *chip* y se cargaron en el canal por centrifugación. Más del 80% de los canales estaban ocupados por células, observación realizada mediante el microscopio óptico convencional. Acto seguido, se inyectó medio fresco M9 (**Figura 13**).



**Figura 13.** Presentación de un *chip* microfluídico. (A) Esquema de un *chip*, formado por 4 canales principales que a su vez se ramifican en cientos de canales de crecimiento. Las flechas amarillas indican el sentido del flujo (2 ml/h) del medio de cultivo. (B) Detalle de los canales de crecimiento. (C) Estirpes e inductores empleados.

### 3.3. Microscopía y microfluídica

Se colocó el *chip* en la pletina de un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti instalado dentro de una cámara termostatzada, previamente calentada a 37°C, y se conectó a una bomba de jeringuillas cargadas con medio mínimo de cultivo M9 e inductores (0.05 mM de IPTG y 0.15% de arabinosa) y, en su caso, el antibiótico cloranfenicol (30 g/l) o el inhibidor de DnaK miricetina (15 g/l) (**Figura 13**). La bomba suministró, a través de un flujo continuo y moderado (2 ml/hora), medio de cultivo a los canales de crecimiento donde se depositan las bacterias. A una magnificación de 100X y controlado por el *software MetaMorph*, se tomaron imágenes, cada seis minutos, de hasta 15 posiciones diferentes por canal. Para ello se empleó una pletina motorizada y una cámara CCD (Photometrics Cool-Snap HQ2). Se utilizaron el filtro ND32 para la amortiguar la iluminación y los siguientes tiempos de exposición: 100 ms de luz transmitida (contraste de fase), 1 seg RFP, 2 Seg YFP. Se siguió el crecimiento y evolución de los microcanales entre 8 horas y 72 horas (Wang y col., 2010c).

Finalmente, las imágenes (.TIF) fueron montadas para la edición de vídeos a través del programa de procesamiento de imagen *ImageJ* (National Institutes of Health). Estos se elaboraron seleccionando aquellos canales en los que se mantuvieron las células en su interior durante un intervalo de tiempo mayor.



## MÉTODOS RELATIVOS A *S. cerevisiae*

### 1. MANIPULACIÓN DEL ADN

#### 1.1. Células competentes y transformación de *S. cerevisiae*

##### 1.1.1. Preparación de células electrocompetentes

A partir de un cultivo crecido durante toda la noche, se inoculó 1 ml en 500 ml de YDP, que se dejaron crecer hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0.8. Se centrifugaron las células durante 5 minutos a 3000 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 500ml de H<sub>2</sub>O fría. Este lavado se repitió dos veces, disminuyendo el volumen a 250 ml y 50 ml cada vez. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 0.5 ml de sorbitol 1 M.

##### 1.1.2. Electroporación de *S. cerevisiae*

Se tomaron 40 µl de células electrocompetentes frescas y se añadió 1 µl de la muestra de ADN. La incubación se prolongó durante 5 minutos en hielo, se transfirió la suspensión a una cubeta de electroporación de 0.2 cm (*BioRad*) y se aplicó en el electroporador *MicroPulser* un pulso de 1.5 kV (programa “Sc2”). La lectura de la constante de tiempo, para una electroporación correcta, ha de rondar los 5 milisegundos. Se transfirieron después las células a medio selectivo con agar conteniendo 1 M de sorbitol. Las placas se incubaron a 30°C durante al menos 48 horas.

### 1.2. Construcción de vectores

Para la elaboración de los plásmidos referentes a los ensayos realizados en la sección de levaduras se utilizaron los oligonucleótidos mostrados en la (**Tabla 7**).

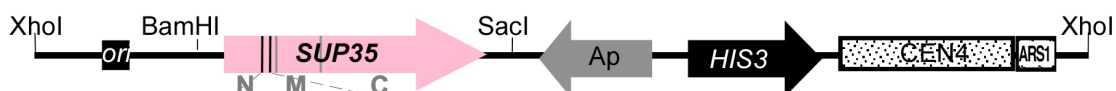
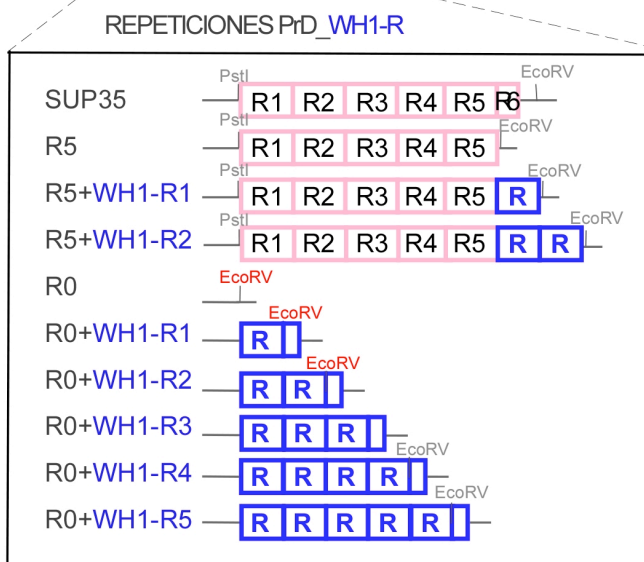
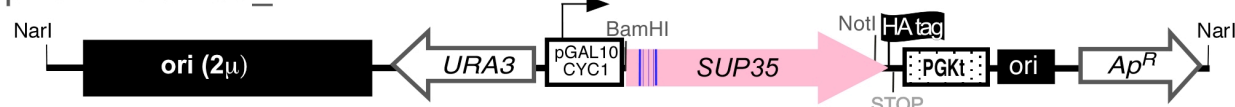
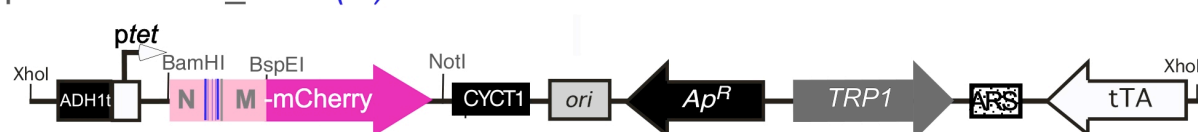
Nombre	Oligonucleótidos (5'-3')	Construcción
BamHI-SUP35	GCGGTT <b>GGATCCT</b> CTTCATCGACTTGCTCG	pUCK_R5
R5-EcoRV	CGAG <b>GATATC</b> CATTGAATTGCTGCTGATAACC	
BamHI-SUP35	GCGGTT <b>GGATCCT</b> CTTCATCGACTTGCTCG	pUCK_R5+WH1-R1
R5+A31V-EcoRV	CGAG <b>GATATC</b> CGATCAAAGACACAGCGCATAGCACTAGA TTGAATTGCTGCTGAT	
BamHI-SUP35	GCGGTT <b>GGATCCT</b> CTTCATCGACTTGCTCG	pUCK_R5+WH1-R2
R5+A31V(2)-EcoRV	CGAG <b>GATATC</b> CGATCAAAGACACAGCGCATAGCACTAGATTG AATTGCTGCTGATCCGATCAAAGACACAGCGCATAGCACTAG ATTGAATTGCTGCTGAT	
PstI-EcoRV_A	TCAAGCTTACAATGCTCAAGCCCAAC <b>GATATC</b> GTGGGTACTA CAAAATTACCAAGG	pUCK_R0
PstI-EcoRV_B	CCTTGGTAATTTGGTAGTACCCAC <b>GATATC</b> GTTGGGCTTGAG CATTGTAAGCTTGA	
Concatémoro_A	GGCCGCCTAGTGCTATGCG <b>GCTGTGTCTTTGATCGAT</b>	pUCK_R0+WH1-R1 pUCK_R0+WH1-R2 pUCK_R0+WH1-R3
Concatémoro_B	GCATAGCACTAGGCGGCC <b>ATCGATCAAAGACACAGC</b>	
EcoRV(A31V)_A	GCGCTGTGTCTTTGATCG <b>GATATC</b> GGCCGCCTAGTGCTATATC	pUCK_R0+WH1-R4 pUCK_R0+WH1-R5
EcoRV(A31V)_B	GATATAGCACTAGGCGGCC <b>GATATC</b> GATCAAAGACACAGCGC	
SUP35-5'_Sec	CGTATTATATCTTACATCATCG	Secuenciación
Rev-EcoRV	CCTTCTTGGTAGCATTTGGC	
BamHI-SUP35	<b>GCGGTTGGATCCT</b> CTTCATCGACTTGCTCG	Serie pYEF <sub>2</sub>
SUP35-NotI	CGAG <b>GCGGCCGCC</b> CTCGCAATTTTAAACAATTTTACC	
5'BspEI-mCherry	GGTTCAT <b>CCGGA</b> ATGGTGAGC	Serie pCM182(I)
mCherry-NotI3'	AAGGAAAAAAG <b>GCGGCCGCT</b> CACTTGTACAGCTCGTCA	
5'BamHI-NM	CTCG <b>GGATCC</b> ATGTCGGATTCAAACCAAGGC	Serie pCM182(II)
NM-3'BspEI	CGAG <b>TCCGGAT</b> TGAACCAGAGCTTCCCATATCGTTAACAACCTTC GTCATC	

**Tabla 7.** Oligonucleótidos empleados para clonar en los plásmidos de *S. cerevisiae*.

### 1.2.1. Sustitución de las repeticiones PrD en Sup35p por repeticiones del dominio amiloidogénico de RepA-WH1(A31V)

Para la realización de la delección y sustitución de las repeticiones del dominio N-terminal de SUP35 (Osherovich y col., 2004), PrD, por sucesivas repeticiones de la región amiloidogénica de RepA-WH1(A31V), R, se empleó el vector pUKC1620, cedido por el laboratorio de Mick F. Tuite (**Figura 14**) (Parham y col., 2001). Todas las construcciones se verificaron mediante corte por

restricción con las enzimas utilizadas al clonar y posterior secuenciación automática del ADN (a través de los oligonucleótidos *SUP35*-5'\_Sec y Rev-EcoRV) (**Tabla 7**).

**A**pUKC1620-*SUP35*\_WH1-R**A.1****B**pYeF2-*SUP35*\_WH1-R**C**pCM182-NM\_*WH1(R)*-mRFP

**Figura 14.** Esquema de los vectores que expresan las versiones truncadas y quimeras *SUP35*\_WH1(R). (A) esquema de vector pCK1620 en el que se clonaron las quimeras. (A.1) Esquema de la delección y sustitución de WH1(R), R (en azul oscuro), por las repeticiones del dominio N (PrD) de *SUP35* (en rosa). El nombre de cada vector esta indicado en la izquierda. (B) Esquema del vector de expresión de las variantes Sup35p bajo el promotor de galactosa. (C) Esquema del vector donde se fusionó la proteína mCherry a las distintas quimeras de NM. Éstas se encuentran bajo el promotor de tetraciclina (Ptet).

#### i. pUKC\_R5

Sobre el plásmido pUKC1620 que contiene el gen *SUP35*, se realizó una PCR con los oligonucleótidos BamHI-*SUP35* y R5-EcoRV (**Tabla 7**) (este último solapa con la repetición R5 de *SUP35*). El producto resultante se digirió con las enzimas de restricción BamHI y EcoRV y se introdujo en el plásmido pUKC1620, tratado previamente con las mismas enzimas.

## ii. pUKC\_R5+WH1-R1

Sobre el plásmido pUKC1620 se realizó una PCR para amplificar las repeticiones del PrD de *SUP35* y sustituir la repetición R6 por la secuencia amiloidogénica WH1-R. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos BamHI-*SUP35* y R5+A31V-EcoRV (**Tabla 7**). Una vez amplificado y tratado con por BamHI y EcoRV, se introdujo en el plásmido pUKC1620 digerido por las mismas enzimas.

## iii. pUKC\_R5+WH1-R2

Se utilizó el mismo procedimiento que para construir pUKC\_R5+WH1-R1, excepto que el oligonucleótido reverso fue R5+A31V(2)-EcoRV (**Tabla 7**)

## iv. pUCK\_RO

Se realizó una mutagénesis dirigida del sitio PstI por el sitio de restricción EcoRV con los oligonucleótidos PstI-EcoRV\_A y PstI-EcoRV\_B (**Tabla 7**). Ésta se hizo sobre el plásmido pUKC1620 utilizando la enzima Pfu ADN polimerasa turbo. Posteriormente, se realizó una digestión con la enzima EcoRV de manera que las repeticiones de *SUP35* fueron eliminadas al religar el plásmido.

## v. pUKC\_R0-WH1-R1, 2 y 3

Primeramente, cada uno de los oligonucleótidos (Concatém ero\_A y B; **Tabla 7**) que poseen la secuencia amiloidogénica WH1-R y que solapan por la región indicada con caracteres azules en la tabla, se fosforilaron utilizando la enzima T4 polinucleótido kinasa durante 30 minutos a 37°C. A continuación, la hibridación entre ellos se realizó a 95°C durante 3 minutos y se ligaron durante toda la noche, a temperatura ambiente, en un volumen final de 25 µl. Finalmente, se trata con la enzima Klenow para rellenar extremos, durante una hora a 37°C.

Por otro lado, el plásmido pUKC\_R0 se digirió con la enzima EcoRV y se desfosforiló con la fosfatasa antártica, durante 15 minutos a 37°C. A continuación, se realizó una ligación entre el fragmento concatenado y el vector digerido. El producto final de la ligación se dializó frente a agua en un filtro Milipore, concentrándose después para ser transformado por electroporación (método descrito anteriormente) en la estirpe *Fusion Blue* de *E. coli* (**Tabla 2**).

## vi. pUKC\_R0-WH1-R4 y 5

Sobre las construcciones pUCK1620\_R0-WH1-R1 y 2 se realizó una mutagénesis dirigida para insertar un sitio de restricción EcoRV (que se había perdido al insertar el fragmento concatenado) tras las repeticiones R1 y R2, respectivamente, a través de los oligonucleótidos EcoRV(A31V)\_A y EcoRV(A31V)\_B (**Tabla 7**). Por otro lado, se solicitó a la empresa *ATG:biosynthetics* la síntesis química de un fragmento de ADN que incluía tres repeticiones de la secuencia amiloidogénica RepA-WH1(A31V), WH1-R3, cuyos extremos poseían los sitios de corte

SmaI y EcoRV, ambos del tipo romo. Tras digerir el fragmento por estas enzimas, se insertó en los vectores pUCK1620\_R0-WH1-R1 y 2, digeridos previamente por EcoRV.

### 1.2.2. Serie de vectores de expresión de proteínas en levaduras, pYeF2

Para la introducción de las quimeras de *SUP35\_WH1(A31V)* en el vector de expresión pYeF2 (**Tabla 5**) (Cullin y col., 1994), se amplificó cada una de ellas por PCR, a partir de la batería de plásmidos construidos sobre pUKC. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos BamHI-SUP35 y SUP35-NotI (**Tabla 7**) cuyos extremos poseen los sitios de restricción BamHI y NotI. El fragmento amplificado se digirió con estas enzimas y se introdujo en el plásmido pYeF2 digerido con BamHI y NotI. Por otro lado, al clonar los genes en el MCS del vector pYeF2 se fusiona en el extremo 3' de cada gen una secuencia que codifica para el epítipo HA (hemaglutinina).

### 1.2.3. Vectores de expresión del dominio quimérico NM\_WH1-R-mCherry, pCM182

Se realizó por un lado la amplificación por PCR del dominio NM de *SUP35*, de NM sin las repeticiones PrD (NM\_RO) y de las quimeras NM\_R5+WH1-R2, NM\_R0+R2 y NM\_R0+R4, utilizando como molde los plásmidos correspondientes a la serie pUCK1620 y los oligonucleótidos 5'BamHI-NM y NM-3'BspEI (**Tabla 7**). Por otro lado, se amplificó el gen mCherry utilizando como molde el plásmido pWH1(A31V)-mCherry y los oligonucleótidos 5'BspEI-mCherry y mCherry-NotI3' (**Tabla 7**). Estos dos fragmentos resultantes se digirieron con la enzima BspEI y se ligaron. Sobre este producto se realizó una segunda PCR utilizando los oligonucleótidos 5'BamHI-NM y mCherry-NotI3'. El fragmento resultante se digirió con las enzimas BamHI y NotI y se introdujo en el plásmido pCM182, previamente tratado con las mismas enzimas.

## 2. BIOQUÍMICA DE LOS AGREGADOS

### 2.1. Expresión de proteínas bajo el promotor de galactosa

Las células de la estirpe BSC783/4a (**Tabla 2**) (cedida por el laboratorio de Mick F. Tuite; Parham y col., 2001), previamente transformadas con la serie de vectores pYEF2, se crecieron primero en YPD-agar y después se inocularon en 200 ml de YPD líquido. Estas se dejaron crecer a 27°C hasta que alcanzaron una DO<sub>600</sub> de 0.5 y, a continuación, se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 rpm a 4°C, eliminándose el sobrenadante y resuspendiéndolas en 200 ml de PBS frío. Se volvieron a centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200 ml de YPD, 2% rafinosa, 0.1% glucosa. Las levaduras se dejaron crecer hasta una DO<sub>600</sub> de 0.5-0.8, momento en el que se indujeron con galactosa (2%). Los cultivos se dejaron crecer hasta una DO<sub>600</sub> de 2. Finalmente, se centrifugaron las células y se resuspendieron en PBS.

### 2.1.1. Lisado de células de *S. cerevisiae*

Tras la sobreexpresión de proteína, las células fueron centrifugadas y, eliminando el sobrenadante, se resuspendieron en 500 µl de solución de lisis (25 mM Tris-HCl pH 6.8, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10% glicerol, más inhibidores de proteasas). Posteriormente, se añadió un tercio del volumen de esferas de vidrio (*Lysing Matrix C-MP*) y se lisaron las levaduras a 4°C en el homogeneizador *FastPrep-MP* (30 seg, potencia V, 5 veces). Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 3 minutos a 2500 rpm, sedimentando las células que no se habían lisado y recuperándose el sobrenadante.

La sobreexpresión se comprobó a través de geles de SDS-PAGE (al 10%) y posterior *Western Blot*, utilizando como anticuerpo primario un anti-HA (dilución 1:1000) y como secundario un anti-ratón conjugado con HRP (dilución 1:10000). La detección de la señal química se realizó mediante quimioluminiscencia (*ECL Plus*).

## 2.2. Caracterización de los agregados

### 2.2.1. Ensayo de sedimentación: fraccionamiento de extractos celulares

Una vez que las células fueron lisadas, se tomaron 200 µl y se centrifugaron a 50000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 µl de solución de lisis.

Las muestras se resuspendieron en tampón de carga de proteínas, hirviéndolas durante 15 minutos y se centrifugaron durante 10 minutos, antes de ser cargadas en un gel de SDS-PAGE (al 10%). Posteriormente, se realizó un *Western blot* utilizando el anticuerpo primario anti-HA (dilución 1:1000) y como secundario un anti-ratón (dilución 1:10000).

### 2.2.2. SDD-AGE de los extractos totales de células de levadura lisadas

Se tomaron 45 µl de la muestra de levaduras lisadas y se le añadieron 15 µl de tampón de carga 4X (TAE 2X, 20% glicerol, 8% sarcosyl, 0,5 g/l azul de bromofenol e inhibidores de proteasas), incubando las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos y cargándolas en un gel 1,5% de agarosa TAE 1X, SDS 0,1%. La electroforesis se desarrolló a 100V-400 mA durante 7,30H a 10°C. La transferencia se realizó como está descrito en el apartado **Métodos 2.2.2)**

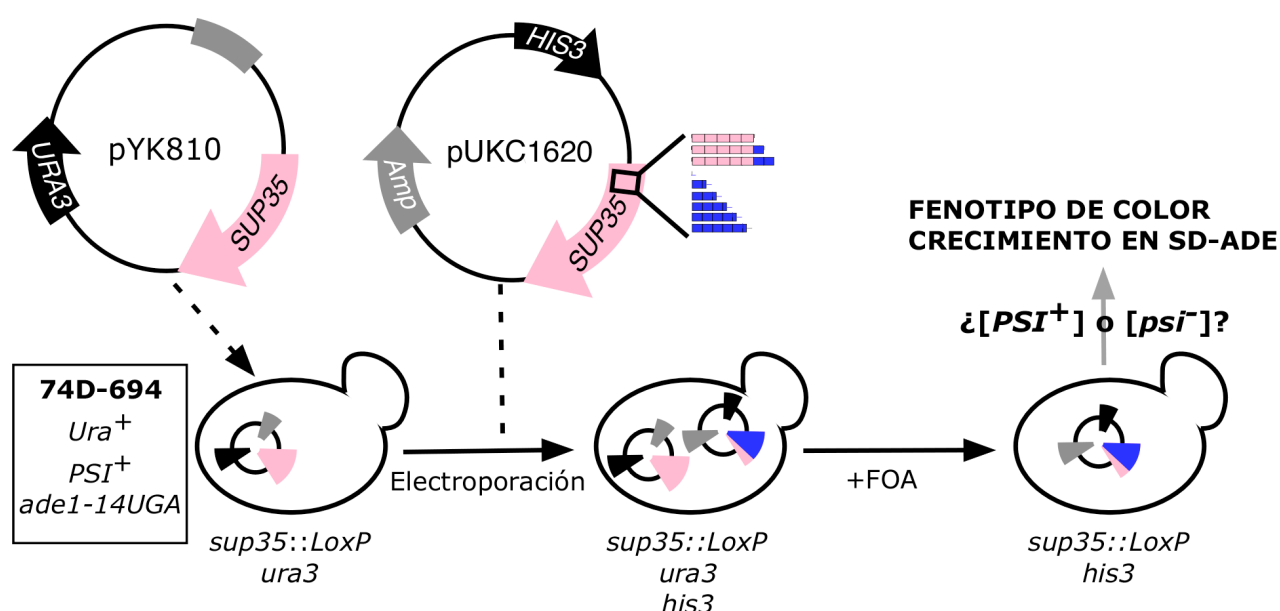
La membrana se bloqueó en TBST suplementado al 5% con leche en polvo desnatada toda la noche y se incubó primeramente con el anticuerpo anti-HA (dilución 1/1000) y después con un anti-ratón conjugado con HRP (dilución 1:10000). La detección de la señal luminescente se realizó usando el reactivo *ECL-Plus*.

### 3. CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL DE LA SECUENCIA WH1-R PARA LA FORMACIÓN DE PRIONES FUNCIONALES

#### 3.1. Ensayo de mantenimiento de $[PSI^+]$

##### 3.1.1. Fenotipo por color y crecimiento en medio deficiente en adenina (SD-Ade)

Para realizar el ensayo de fenotipo por color (**Figura 15**) (Parham y col., 2001), se utilizó la estirpe 74D-694 (**Tabla 2**) (von der Haar y col., 2007). El hecho de que *SUP35* sea un gen esencial y que sea necesario trabajar con una estirpe  $\Delta SUP35$ , motivó el que se utilizase el auxilio del plásmido pYK810 (Kikuchi y col., 1988), que contiene una copia del gen *SUP35*. Esta estirpe, que posee el gen *SUP35* interrumpido por la secuencia *LoxP*, fue cedida por el laboratorio de Mick F. Tuite.



**Figura 15.** Esquema del ensayo del mantenimiento de  $[PSI^+]$  por las versiones truncadas de Sup35p en la estirpe 74D-694. Esta estirpe posee una disrupción en el gen *Sup35::loxP* y porta una copia silvestre de *SUP35* en el plásmido pYK810. Los plásmidos derivados de pUKC1620, que poseen alelos modificados en el extremo N-terminal de *SUP35* por repeticiones de WH1(R), se transforman y se seleccionan en medio que contiene FOA. El fenotipo  $[PSI^+]$  se valora por la supresión del alelo *ade1-2* que, de no ser suprimido, se manifiesta en un fenotipo de color rojizo y por ausencia de crecimiento en medio sin adenina.

El plásmido pUKC1620 (con los distintos alelos de *SUP35* modificados con WH1-Rs) (**Tabla 4**) se electroporó en la estirpe 74D-694 [pYK810]. Los transformantes se seleccionaron en medio SD-His. Éstos fueron posteriormente replicados en placas cuyo medio contenía 5-FOA (ácido 5-fluoro-orótico), ya que el plásmido pYK810 (**Tabla 4**) porta el marcador *URA3*: en presencia de FOA se seleccionaron las células que habían perdido pYK810 (el ácido 5-FOA genera un producto letal debido a la acción de Ura3p) (Kaiser y col., 1994). Finalmente los transformantes se sembraron en placas de agar con medio ¼ YPD (para resaltar la coloración rojiza) y, tras 52 horas de crecimiento, se observó el fenotipo color blanco o rojo de cada una de las estirpes. Por otro

lado, un duplicado de los transformantes se sembró placas SD-Ade y se observó el crecimiento (o no) en este medio selectivo.

### 3.1.2. Ensayo de curación de [*PSI*]: efecto del cloruro de guanidina

A partir de un inóculo crecido durante toda la noche y tras diluirlo a una  $DO_{600}$  inicial de 0.1, el cultivo de levadura se dejó crecer durante 4 horas (a 30°C). Transcurrido este tiempo se le añadió cloruro de guanidina (4 mM) y, tras 3 horas de crecimiento, se llevó cada cultivo a una  $DO_{600}$  de 0.01, volviendo a añadir éste a la misma concentración, y se dejó crecer durante toda la noche. Al día siguiente el cultivo control (sin cloruro de guanidina) se llevó a la DO del cultivo con guanidina y ambos se dejaron crecer durante 8 horas. Finalmente, se sembraron las células en placas con medio ¼ YPD y, tras 72 h de crecimiento a 30°C, se realizó el recuento del número de células rojas y blancas.

## 3.2. Visualización de los agregados al microscopio de fluorescencia

### 3.2.1. Sobreexpresión de las quimeras de NM\_WH1-R rojas fluorescentes por inducción con doxiciclina (TET-ON)

Se utilizó la estirpe 74D  $\Delta$ NM (**Tabla 2**), cedida por el laboratorio de Susan Lindquist, (Chernoff y col., 1995) para la expresión de la colección de proteínas NM\_WH1-R (NM-mCherry, NM(R0)-mCherry, NM\_R0+WH1-R2-mCherry y NM\_R0+WH1-R4-mCherry). Éstas se habían clonado en el plásmido pCM182 (**Tabla 4**) (Garí y col., 1997; cedido por Martí Aldea) bajo un promotor regulable por tetraciclina (inducible por doxiciclina). La estirpe 74D  $\Delta$ NM, fue elegida ya que posee una copia de *SUP35* deletada en su dominio formador del prion PrD ( $\Delta$ NM) haciendo que el dominio de terminación de la traducción (C-terminal) sea inmune al secuestro por la agregación amiloide, garantizando así su viabilidad (Tyedmers y col., 2010b).

De un cultivo saturado de 74D  $\Delta$ NM (transformada con los plásmidos, pCM182\_NM-mCherry, pCM182\_NM(R0)-mCherry o pCM182\_NM-WH1(R2/R4)-mCherry) se preparó una dilución 1/100 en medio YPD líquido, se le añadió doxiciclina (1 g/l) y se dejó crecer durante toda la noche. Al día siguiente se diluyó de nuevo el cultivo (1/100) y se le añadió 0.01 g/l de doxiciclina, dejándolo crecer hasta el día siguiente. Este proceso se repitió de igual manera para la estirpe MW123 (**Tabla 2**) ( $\Delta$ *ssa1* y  $\Delta$ *ssa2*), cedida por el laboratorio de E. Craig (Werner-Washburne y col., 1987), asimismo transformada con los vectores pCM182 que portaban las fusiones a mRFPs (mCherry).

Finalmente, las muestras se fijaron siguiendo el mismo protocolo aplicado a las bacterias y para su visualización al microscopio de fluorescencia.



---

## **V. RESULTADOS**

---

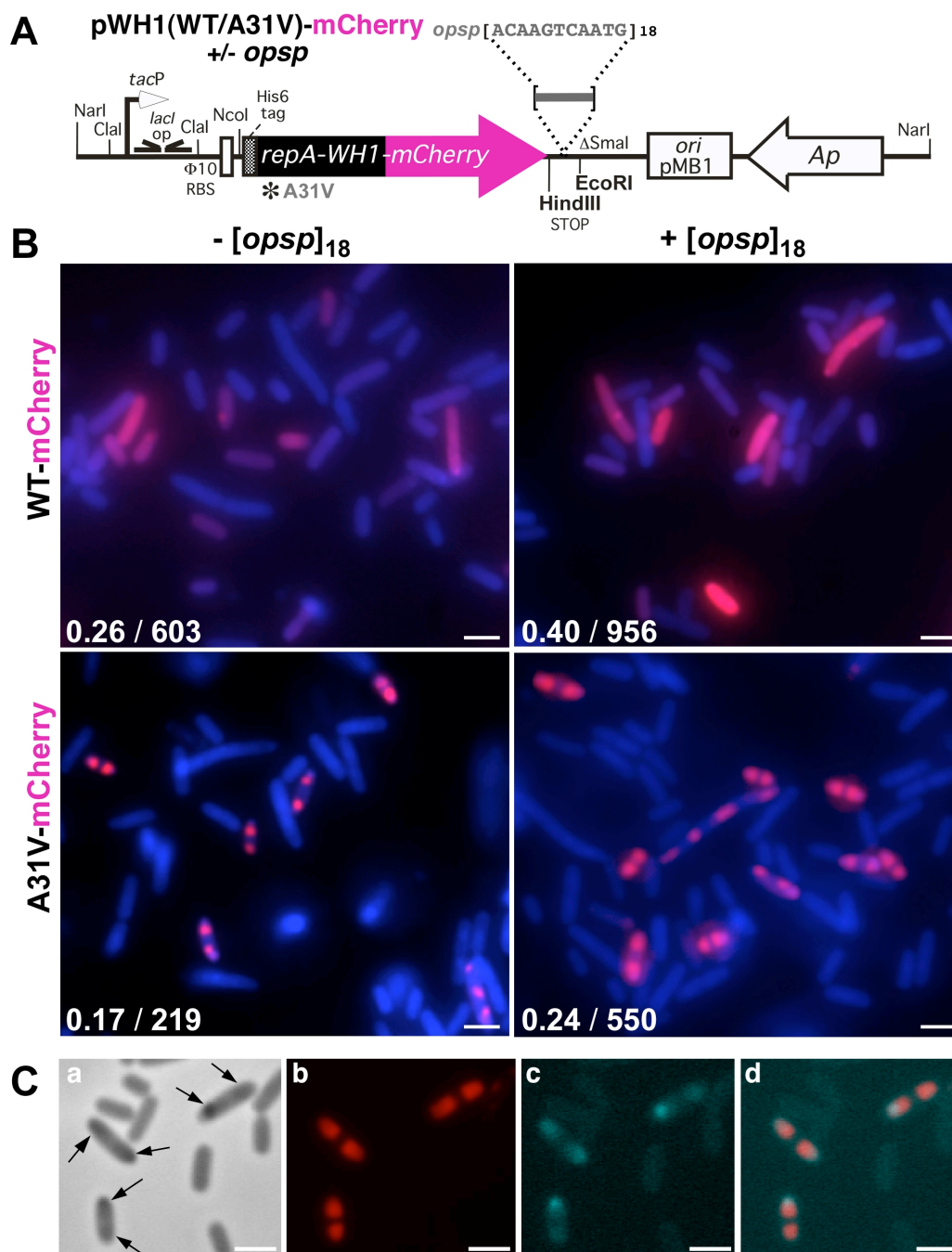
## 1. EFECTO DEL AMILOIDE WH1(A31V) EN *E. coli in vivo*

### 1.1. Efecto del ADN en la agregación intracelular

La secuencia que codifica el dominio WH1 de la proteína RepA silvestre (WT), así como la forma mutante A31V, que tiene su potencial amiloidogénico aumentado (Giraldo, 2007), fueron clonadas fusionadas a una versión monomérica de la proteína roja fluorescente (mCherry; Shaner y col., 2004), en un plásmido de alto número de copias inducible con IPTG. En paralelo, se construyeron sobre estos mismos plásmidos, vectores con 18 repeticiones en tándem de la secuencia de ADN de 11 pb *opsp*, secuencia que promueve la amiloidosis de RepA-WH1 *in vitro* (Giraldo, 2007; Gasset-Rosa y col., 2008b). Las repeticiones (*opsp*)<sub>18</sub> fueron clonadas justo después del gen *WH1-mCherry*, de manera que, teniendo en cuenta la limitación de la difusión de macromoléculas impuesta por la aglomeración del citoplasma (Zhou y col., 2008), se favorezca la unión de la proteína recién sintetizada a las secuencias diana del ADN adyacente (**Figura 16.A**).

El análisis por microscopía de fluorescencia de la estirpe bacteriana MC4100, que expresa el represor LacI<sup>q</sup>, transformada con pWH1(WT)-mCherry mostró, tras inducir con IPTG, una señal difusa con distintas intensidades de fluorescencia a lo largo del citoplasma. Por el contrario, la expresión de la variante A31V dió lugar a la aparición de al menos dos intensos focos fluorescentes, generalmente localizados en posiciones  $\frac{1}{4}$  y  $\frac{3}{4}$  a lo largo del citoplasma, en el 17% de las células. El alto número de copias que posee el plásmido con la secuencia (*opsp*)<sub>18</sub> (40-250 por célula), incrementó el porcentaje de células que poseían marcaje fluorescente hasta un 40% en WH1(A31V) (**Figura 16.B**). Además los focos en presencia de las copias adicionales de *opsp* son de mayor tamaño que aquellos observados en su ausencia ( $0.93 \pm 0.15 \mu\text{m}^2$  frente a  $0.52 \pm 0.08 \mu\text{m}^2$ , respectivamente). En todos los demás experimentos expuestos en las secciones I y II se han incluido las repeticiones *opsp* con el fin de potenciar la incorporación de moléculas de WH1(A31V) a las inclusiones.

El fluoróforo BTA-1 es un derivado de la tioflavina (Th-T) específico de las estructuras amiloides en lámina- $\beta$  cruzada. Además, posee la capacidad de penetrar la membrana celular y de no unirse al ADN (Cordeiro y col., 2001). Estas propiedades son derivadas de su carga neutra en lugar de positiva, como la de Th-T (Wu y col., 2008). En bacterias que expresaban WH1 (A31V)-mCherry, BTA-1 colocalizaba con las inclusiones, indicando la naturaleza amiloide intrínseca de los núcleos de agregación (**Figura 16.C**).



**Figura 16.** Rep-WH1(A31V) fusionada a mCherry se acumula como inclusiones amiloides en el citoplasma de *E. coli*. (A) Esquema lineal de los plásmidos utilizados para la sobreexpresión de WH1-mCherry bajo el promotor *tac*. Se indican las variantes WT y A31V (\*) y las repeticiones (*opsp*)<sub>18</sub> localizadas en *cis*. (B) Imágenes de *E. coli* MC4100 transformada con los plásmidos pWH1(WT/A31V) +/- [*opsp*]<sub>18</sub>. Después de 2 horas de inducción con IPTG, las células se fijaron y se incubaron con DAPI para la visualización del ADN. Se muestran superpuestas áreas representativas de imágenes tomadas por microscopía de fluorescencia tras la excitación a 546 nm (emisión en rojo, mCherry) y 360 nm (emisión azul, DAPI). En la esquina inferior izquierda, se muestra la fracción decimal de las células fluorescentes rojas y el número de células totales contadas. WT genera una señal difusa mientras que A31V dos núcleos intensos. La presencia de *opsp* incrementa la intensidad de fluorescencia. (C) Tinción con el fluoróforo amiloidofílico BTA-1 de células inducidas con A31V-mCherry. (a) Imagen en contraste de fase; las flechas indican las inclusiones citoplasmáticas densas. (b) Imagen de fluorescencia intrínseca roja (mCherry). (c) Tinción con BTA-1 (verde-azulado). (d) Superposición de las imágenes (b) y (c), en la que se aprecia colocalización de los focos rojos y verdes, que coinciden con las inclusiones en (a). La barra representa 2  $\mu$ m.

## 1.2. Toxicidad de RepA-WH1(A31V)

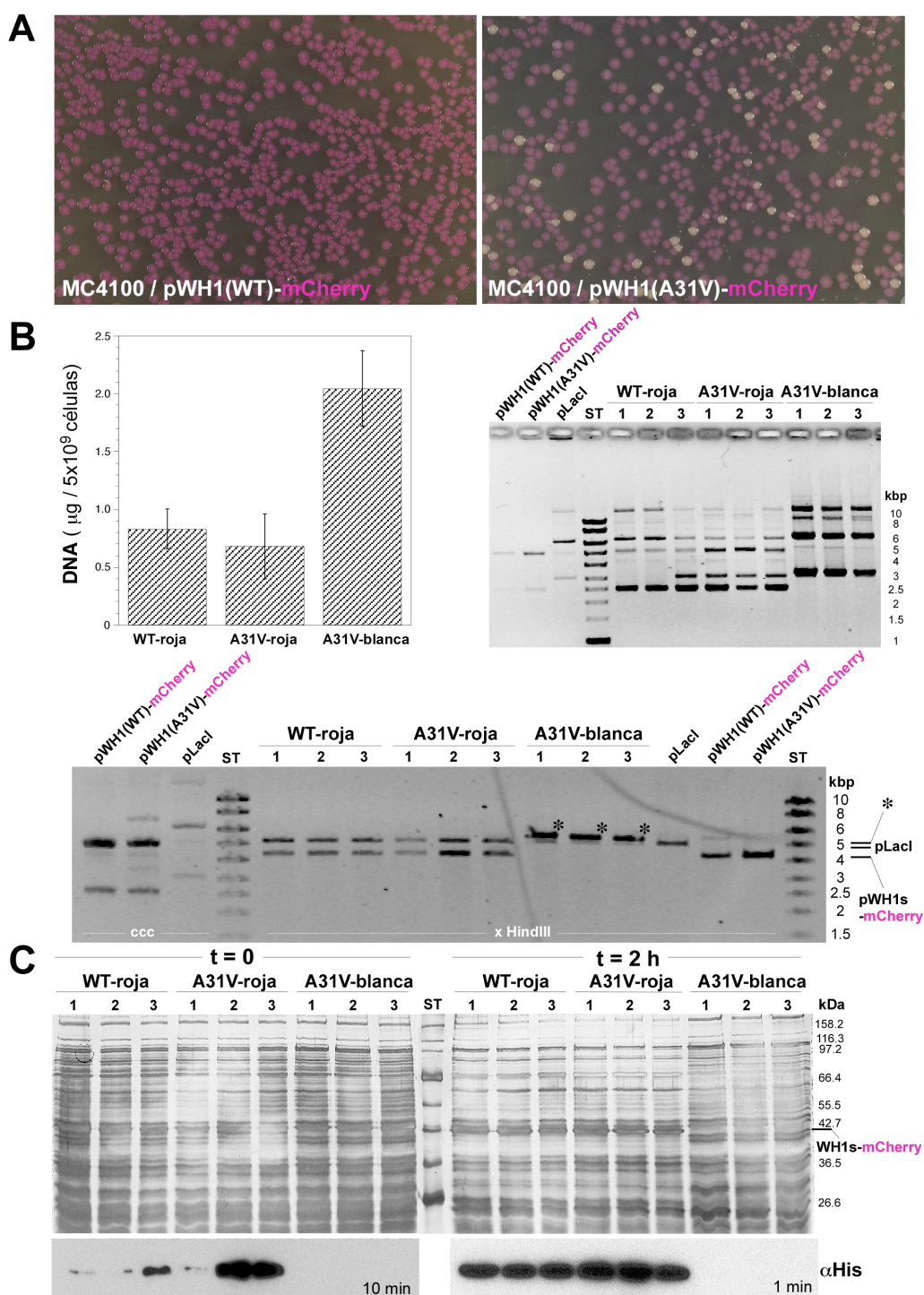
### 1.2.1. Fenotipos en la transformación

#### i. Eficiencia de transformación

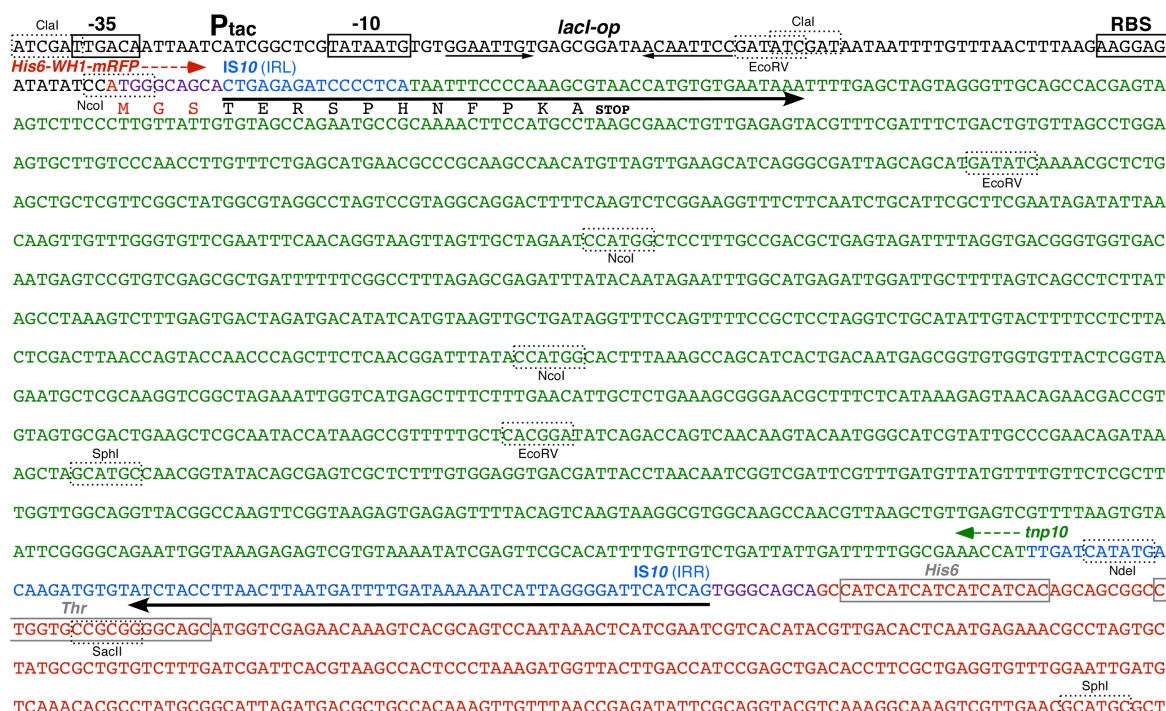
Cuando se transformaron los plásmidos pWH1-mCherry en la estirpe MC4100, la construcción que portaba la proteína WT presentaba el doble de eficiencia de transformación que la del mutante A31V. Por otro lado, existía una diferencia de tonalidad entre ellas: las colonias WH1(WT) tenían un color rojo intenso, mientras que las colonias WH1(A31V) presentaban dos tipos tonalidades, unas de color rojo más pálido que las WT, (en un 90% de los clones) y otras blancas (en un 10%), siendo además estas últimas de mayor tamaño (**Figura 17.A**). Resultados similares se obtuvieron también para las estirpes MG1655 y *Fusion Blue* de *E. coli* K12.

#### ii. Transposición del elemento móvil *IS10*

Cuando se realizó el aislamiento de los plásmidos de las colonias rojas tanto de la estirpe WT como de la A31V se pudo observar que sus tamaños eran iguales, mientras que los plásmidos aislados de las colonias blancas presentaban un aumento de tamaño y del número de copias (de 2.5 a 3 veces) con respecto a los dos primeros. El análisis por restricción mostró que las colonias blancas presentaban plásmidos, aproximadamente, 1Kpb mayores de lo esperado (**Figura 17.B**). La secuenciación de su ADN mostró que en todos procedentes plásmidos de colonias blancas, se había insertado un elemento genético móvil *IS10* (De Palmenaer y col., 2008) en la secuencia del gen *WH1(A31V)-mCherry* (**Figura 18**). Esta inserción provocó la no expresión de la proteína de fusión, como se confirmó mediante *Western blot* (**Figura 17.C**). La inactivación de ORFs por transposición de elementos *IS10* ha sido descrita en otros plásmidos de *E. coli* que mostraban expresión proteica defectiva (Bogosian y col., 1993). Esta era una primera señal de la diferencia de toxicidad entre la variante amiloidogénica A31V y su versión WT y por otro lado, demuestra la plasticidad que posee el genoma bacteriano en respuesta a estrés. En todos los experimentos posteriores se trabajó con inóculos de colonias rojas de siembra reciente.



**Figura 17.** Efecto fenotípico de la transformación de pWH1(A31V)-mCherry en células de *E. coli* MC4100. (A) Se transformó dicha estirpe con los plásmidos pWH1(A31V/WT)-mRFP+ (opsp)18 y se sembró en placas de LB-ampicilina. Aparecen diversas tonalidades de colonias, rojas y blancas. (B) De los transformantes resultantes (de colonias tanto rojas como blancas) se purificó por triplicado el ADN plasmídico, se cuantificó por absorción ultravioleta y se analizaron las formas superenrolladas por electroforesis en geles de agarosa (se cargó en el gel 1/15 de cada preparación de DNA) tras su digestión con HindIII, enzima de supuesto corte único. Las colonias A31V-blancas poseen todas ellas un plásmido de tamaño inesperado, 1 Kbp mayor (\*), que los de las colonias rojas. (C) Se analizaron por SDS-PAGE y tinción con plata los lisados de células. Se seleccionaron por triplicado células de colonias rojas y blancas a  $t=0$  (preinducción) y a las dos horas tras la inducción con IPTG (0.5 mM). Posteriormente, se analizaron por inmunodetección utilizando un anticuerpo monoclonal anti-His. Las colonias blancas no presentan señal de la proteína RepA-WH1(A31V).



**Figura 18.** El elemento genético móvil *IS10* interrumpe el gen *His6-WH1(A31V)-mCherry* localizado en plásmidos aislados de colonias blancas de *E. coli* MC4100. Se representa la secuencia del ADN de la mitad 5' de *His6-WH1(A31V)-mCherry* de plásmidos aislados de 3 colonias blancas independientes. *His6-WH1-mCherry* se destaca en color rojo; las secuencias relevantes del vector de expresión en negro: el promotor *P<sub>tac</sub>*, con las cajas -35 y -10, las repeticiones del operador invertido de *LacI* y el sitio de unión al ribosoma (RBS) del ARNm. Un análisis bioinformático (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/index.html>) identificó la secuencia de 1329 pb como un miembro de la familia de elementos de inserción *IS10*, que incluye su transposasa (*tnp10*, en verde). Los límites de *IS10* se indican en azul, mientras que las flechas negras muestran las repeticiones terminales invertidas, a la izquierda (TRL) y a la derecha (IRR). El mecanismo de transposición conlleva la duplicación de una secuencia diana de 9 pb (en morado).

## 1.2.2. Proliferación celular

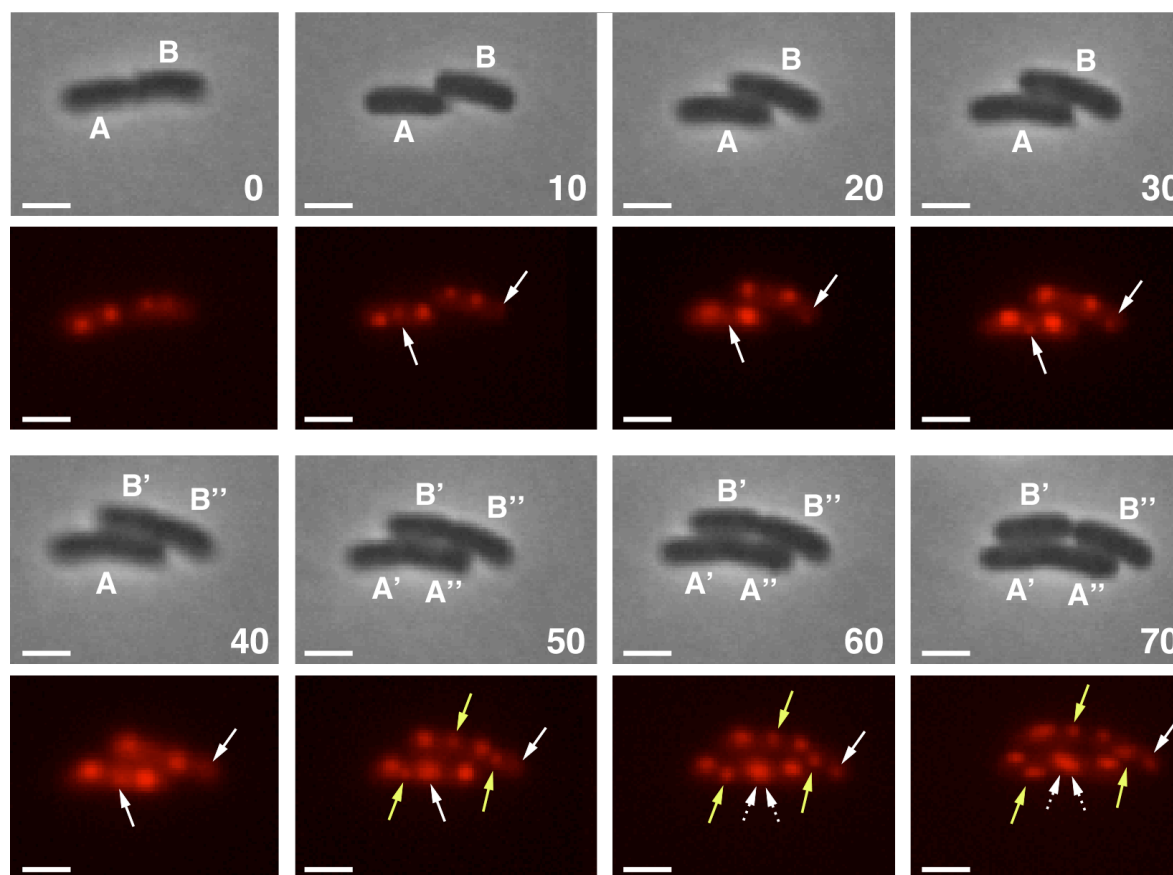
### i. Efecto de los agregados en la división

Para estudiar si las inclusiones resultan perjudiciales para el crecimiento de las células de *E. coli* se realizaron estudios de microscopía de fluorescencia a tiempos seriados (*time-lapse*). Las células que sobreexpresaban la proteína WT como señal difusa en el citoplasma, presentaban 1.7 veces aumentado su tiempo de generación en comparación con células no fluorescentes (**Película S1**), mientras que las células que portaban los focos fluorescentes (A31V sobreexpresada) presentaban aumentado su tiempo de generación hasta en 5 veces (**Película S1**). Esto hace que las células sin inclusiones fluorescentes se conviertan en la población celular mayoritaria de las microcolonias. Este resultado es compatible con la observación de la disminución de la intensidad rojiza de las colonias A31V con respecto a las WT cuando se transformaban en MC4100 (**Figura 17**), ver apartado **Resultados 1.2.1.ii**.



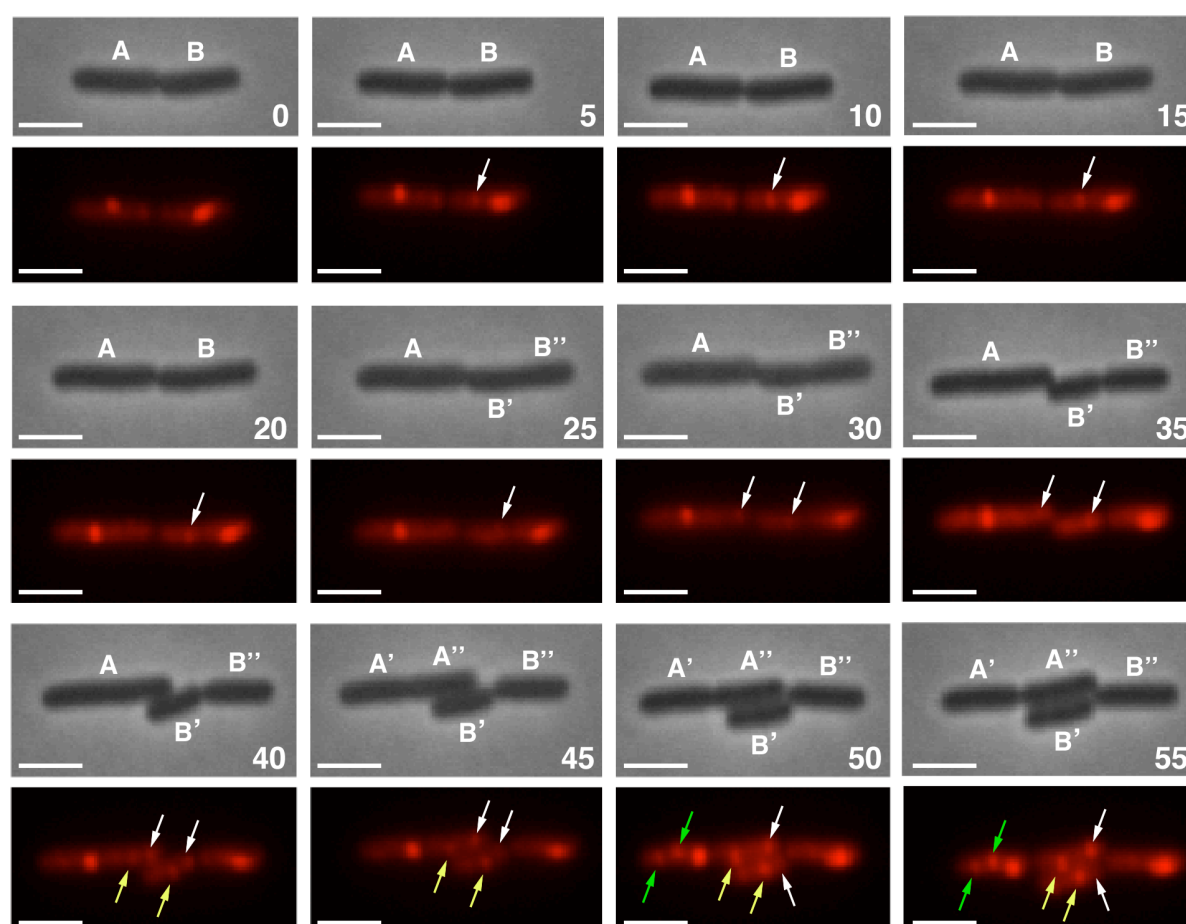
## ii. Transmisión vertical de las inclusiones: RepA-WH1 como *prionoide*

El seguimiento de la proliferación de las células mediante *time-lapse*, mostró que las inclusiones WH1(A31V)-mCherry se transmitían de célula madre a hijas (**Figura 19.a, 19.b**). Se observó cómo 20-30 minutos antes de la constricción ecuatorial que divide las células hijas (indicación morfológica de citoquinesis) aparecía al menos una partícula pequeña extra en el citoplasma (flecha). La situación más frecuente era la de células que, poseyendo dos grandes agregados sub-polares, mostraban la emergencia de una partícula fluorescente central con tendencia a localizarse en medio del citoplasma, cerca del nuevo polo celular (**Figura 19.a**, células marcadas como A y B''). En el momento de la división, ese primordio amiloide suele crecer hasta alcanzar el tamaño de una inclusión madura proteica, que puede llegar a impedir temporalmente la septación y da lugar a células elongadas (**Figura 19.a** A' y A''). Las células detenían entonces su división hasta que eventualmente se producía la herencia asimétrica de la inclusión central.



**Figura 19.a** Dinámica *in vivo* de las inclusiones WH1(A31)-mCherry seguidas por microscopía *time-lapse*. Se muestran imágenes de dos células de *E. coli*, marcadas como A y B, que portan partículas de inclusión y que crecen en LB-agar a 37°C (fila primera y tercera, imágenes en contraste de fases; fila segunda y cuarta, fluorescencia mCherry). Se tomaron imágenes seriadas, a los intervalos de tiempo indicados en la parte inferior derecha de cada imagen, empezando 15 minutos después de la adición del IPTG. Las células hijas están marcadas como *prima* (') (primera generación) y *secunda* (') (la segunda generación). Las flechas indican las partículas fluorescentes emergentes, de color acorde con su orden de aparición (blanco → amarillo). La barra representa 2 μm.

Otro tipo de células eran las que poseían una inclusión central y otra subpolar (**Figura 19.a B**), donde la partícula fluorescente emergía en el polo vacío, produciéndose una citoquinesis asimétrica entre las células hijas, de modo que cada una llevaba o una sola inclusión (**Figura 19.a B'**) o dos inclusiones sub-polares (**Figura 19.a B''**). Si se observan con detalle las células que poseen una inclusión central (**Figura 19.b célula A**), se puede descubrir que la citoquinesis es capaz de distribuir asimétricamente la inclusión de la célula madre a una de las células hijas, que tendrá posteriormente localización sub-polar (**Figura 19.b A'**). La transmisión de amiloides a la otra célula hija dependerá de la aparición espontánea, presumiblemente promovida por ADN, de un nuevo primordio amiloide. Esta situación es una fuente potencial de “curación”, proceso por el cual las células quedan desprovistas de inclusiones. Si la inclusión única tenía localización subpolar, la nueva partícula emergente aparecería en polo celular opuesto (**Figura 19.b célula B y A'**), continuando el proceso de propagación. Por otro lado, la célula hija que portaba la inclusión cerca del polo y que se había dividido ya dos veces permanecía quiescente, mostrando una reducción de su capacidad proliferativa.



**Figura 19.b** Dinámica *in vivo* de las inclusiones WH1(A31)-mCherry seguidas por microscopía *time-lapse* a intervalos de tiempo de 5 minutos. Crecimiento y división de células con una inclusión amiloide central (A) o subpolar (B). Las flechas que apuntan a las partículas emergentes fluorescentes WH1(A31V)-mCherry están coloreadas siguiendo el orden: blanco→amarillo→verde. Se aprecian 3 generaciones sucesivas de primordios amiloides. La barra representa 2  $\mu$ m.

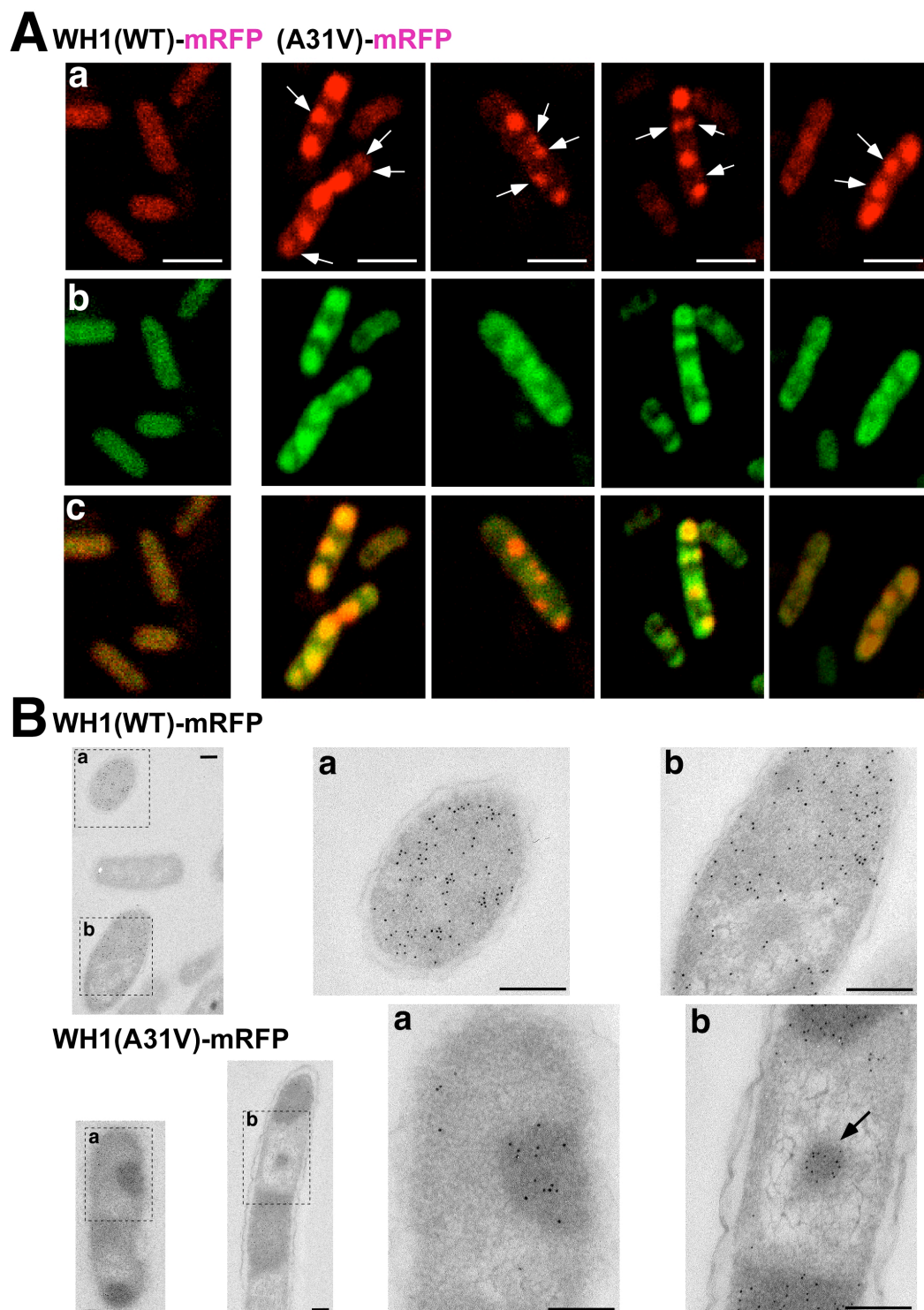


La expansión del tiempo de generación y la quiescencia de células que poseen el polo viejo son síntomas de envejecimiento en células de *E. coli* que portan cuerpos de inclusión (Stewart y col., 2005; Lindner y col., 2008; Winkler y col., 2010). Los cuerpos de inclusión presentan más homogeneidad en tamaño y distribución citoplasmática, un número más reducido y, además, generan menor toxicidad (Lindner y col., 2008; de Groot y col., 2009) que las inclusiones WH1 (A31V)-mCherry.

### **1.3. Características ultraestructurales y distribución intracelular de las inclusiones amiloides**

Con el fin de estudiar la estructura de las inclusiones amiloides intracelulares se analizaron secciones celulares mediante microscopía confocal e inmuno-microscopía electrónica (iME). Las proteínas de fusión fueron marcadas con anticuerpos que reconocen el epítipo de seis histidinas situado en su extremo N-terminal y aquéllos fueron localizados a su vez con anticuerpos conjugados con un fluorocromo verde (microscopía de fluorescencia) o con nano-partículas de oro (iME).

Las secciones confocales de células que portaban la proteína WH1(WT)-mCherry mostraban como ésta se distribuía homogéneamente a lo largo del citoplasma, mientras que en el caso de la variante A31V se agrupaba en inclusiones o focos (**Figura 20.A**).



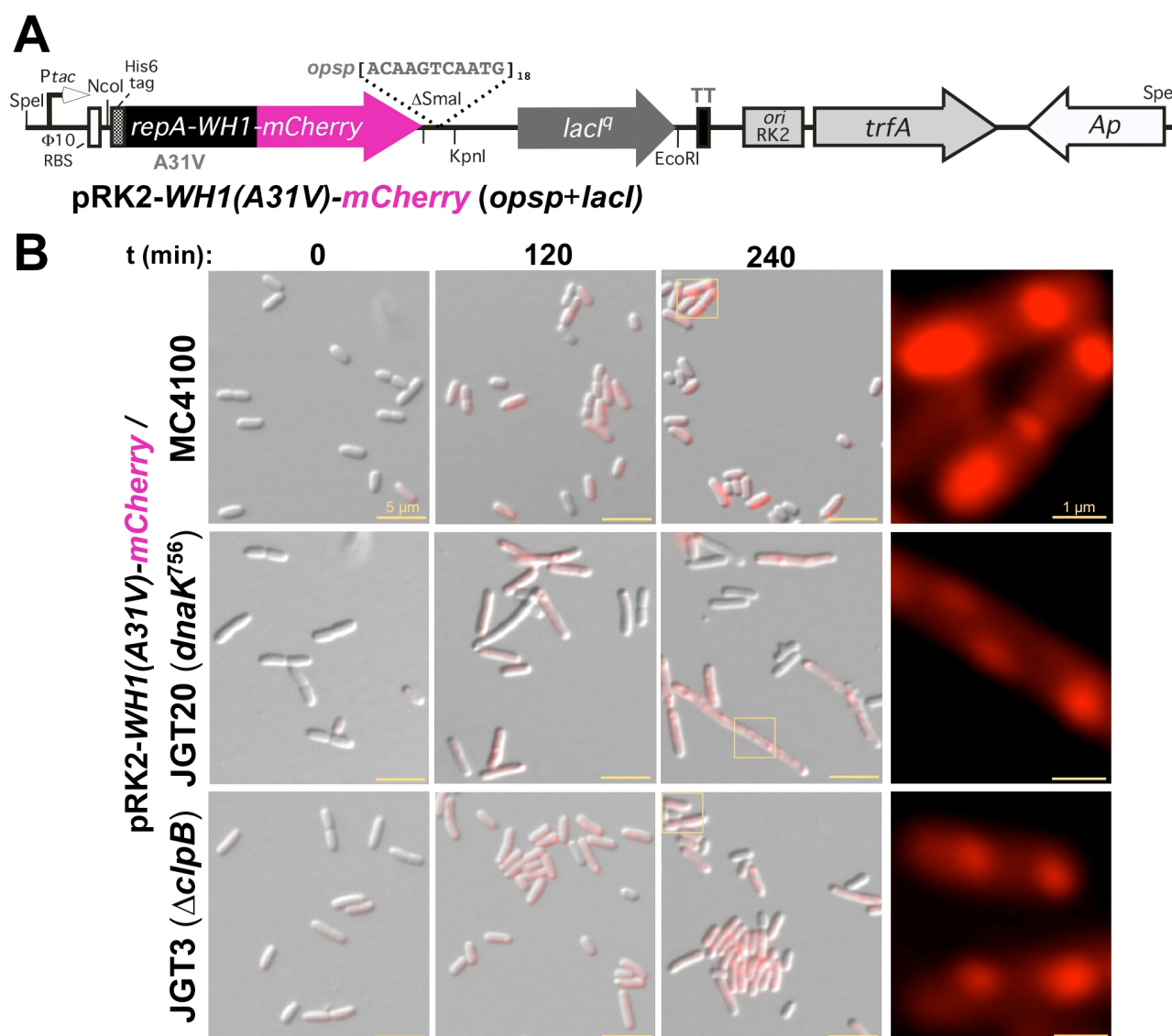
**Figura 20.** Análisis ultra-estructural de las inclusiones amiloides en células de *E. coli* MC4100. (A) Secciones confocales ( $\Delta z = 0.204 \mu\text{m}$ ) de bacterias que expresan WH1(WT)-mCherry (izquierda) o WH1(A31V)-mCherry (derecha). Se muestra la fluorescencia mCherry (a, rojo); la señal del anti-His con etiqueta fluorescente (b, verde); (c) la superposición de (a) y (b). Las flechas indican los primordios amiloides. La barra representa  $3 \mu\text{m}$ . (B) Inmuno-electro microscopía de secciones finas a lo largo de bacterias que expresan WH1-mCherry, tanto WT (panel superior) como A31V (abajo). Los cuadrados se corresponden con las regiones amplificadas a la derecha. Los anticuerpos conjugados con partículas esféricas de oro ( $\varnothing \approx 10 \text{ nm}$ ) decoran el anticuerpo primario, unido a su vez a los complejos de proteína His6-WH1(A31V). La señal se localiza en las regiones electrondensas donde se disponen los agregados WH1(A31V). En cambio, está dispersa a lo largo del citoplasma en WH1(WT). La flecha señala un primordio oligomérico amiloide. Las barras representan  $200 \text{ nm}$ .

Se apreciaron en las imágenes de iME cómo las células que expresaban WH1(A31V) presentaban inclusiones electrondensas de mayor volumen, segregadas del nucleóide, éste último identificado por los filamentos de nucleoproteínas (**Figura 20.B**). También se identificaron pequeños primordios amiloides oligoméricos en forma de inclusiones electrondensas, que estaban marcados a su vez por las partículas de oro (**Figura 20.B**, arriba; flecha en panel b).

## **2. FACTORES INVOLUCRADOS EN LA AMILOIDOSIS DE WH1(A31V): CHAPERONAS**

### **2.1. Amiloidogénesis en estirpes de *E. coli* deficientes en chaperonas (*dnaK<sup>ts</sup>/clpB*)**

Con el fin de obtener una expresión más regulada de los amiloides RepA-WH1, en lugar de utilizar el plásmido de alto número de copias pWH1-(A31V)-mCherry, derivado de pUC18 (50-250 copias/célula), se clonó de nuevo el módulo *repA-WH1(A31V)-mCherry* más el promotor *P<sub>tac</sub>* y el gen del represor *lacI<sup>q</sup>* en un replicón RK2, de menor número de copias (5 a 8 por célula) (**Figura 21.A**). El hecho de que el propio represor esté clonado junto al gen *repA-WH1(A31V)* hace que la represión esté más regulada y por lo tanto los niveles basales de proteína previos a la inducción por IPTG sean casi nulos. Disponíamos así de un sistema de expresión de la proteína RepA-WH1 (A31V) más apropiado para la realización de estudios fisiológicos.



**Figura 21.** Expresión del amiloide RepA-WH1(A31V)-mCherry en las estirpes de *E. coli* MC4100 (silvestre), o en mutantes isogénicas para las dos chaperonas de estudio: *dnaK756<sup>ts</sup>* (JGT20) o  $\Delta clpB$  (JGT3). (A) Esquema lineal (no dibujado a escala) del vector utilizado para expresar el *prionoide* RepA(A31V)-mCherry. (B) Imágenes capturadas en el microscopio de fluorescencia de campos representativos formados de cultivos después de la inducción con IPTG. Se superponen las imágenes de DIC y de fluorescencia roja. La columna de la derecha muestra (emisión roja fluorescente) una magnificación de 6 veces de los sectores encuadrados en amarillo. Se observa en la estirpe JGT20 una disminución de las células que poseen fluorescencia y el aumento de tamaño de las mismas.

El plásmido resultante, pRK2-WH1(A31V)-mCherry, se transformó en las estirpes de *E. coli* MC4100 y sus isogénicas JGT20 (*dnaK756*) y JGT3 ( $\Delta clpB$ ). El hecho de que *dnaK* sea un gen esencial, hace que fuera necesario el empleo de un alelo termosensible en lugar de nulo. En las condiciones de crecimiento utilizadas, la chaperona DnaK756 es ineficaz en la asistencia al plegamiento de proteínas *in vitro* (Buchberger y col., 1999) y en la replicación del ADN tanto *in vitro* como *in vivo* (Giraldo-Suárez y col., 1993). Ya que la biogénesis de los ribosomas depende de DnaK (Alix y Guerin, 1993), no es sorprendente que la expresión de RepA-WH1(A31V)-

mCherry en la estirpe *dnaK756* fuera de un 60% con respecto a los niveles expresados en las otras dos estirpes (**Figura 23.A**).

### 2.1.1. Microscopía de fluorescencia

#### i. Expresión del prionoide RepA-WH1(A31V)

La expresión de RepA-WH1(A31V), después de 30 minutos de inducción con IPTG, da lugar a la acumulación de grandes corpúsculos fluorescentes con distribución y número heterogéneos. Se ensayó en las tres estirpes MC4100, JGT20 (*dnaK756*) y JGT3 ( $\Delta clpB$ ) (**Figura 21.B**), siendo el aspecto de las partículas idéntico en todas ellas y a su vez igual que el observado cuando la expresión de la proteína provenía del plásmido de alto número de copias pWH1(A31V), como se apuntó en el apartado anterior (Fernández-Tresguerres y col., 2011).

De las tres estirpes en las que se sobreexpresó RepA-WH1(A31V), el fenotipo más destacado es el observado en la estirpe con fondo *dnaK756*: se apreció una disminución de la población de células que poseen focos fluorescentes (de un 40-50% a las 2 y 4 horas de inducción, respectivamente) (**Figura 21.B, 25.A**). En cambio, esto no ocurrió en la estirpe  $\Delta clpB$ , pues todas las células portaban núcleos fluorescentes. Por otro lado, cabe destacar que las células JGT20 incrementaban su tamaño promedio y filamentaban, fenotipo característico de estirpes con el alelo *dnaK756* sometidas a condiciones de choque término a 42°C (Bredeche y col., 2001). Parece que, aun a temperaturas permisivas, la expresión a largo plazo del prionoide provoca filamentación celular (**Figura 21.B, 25.B**).

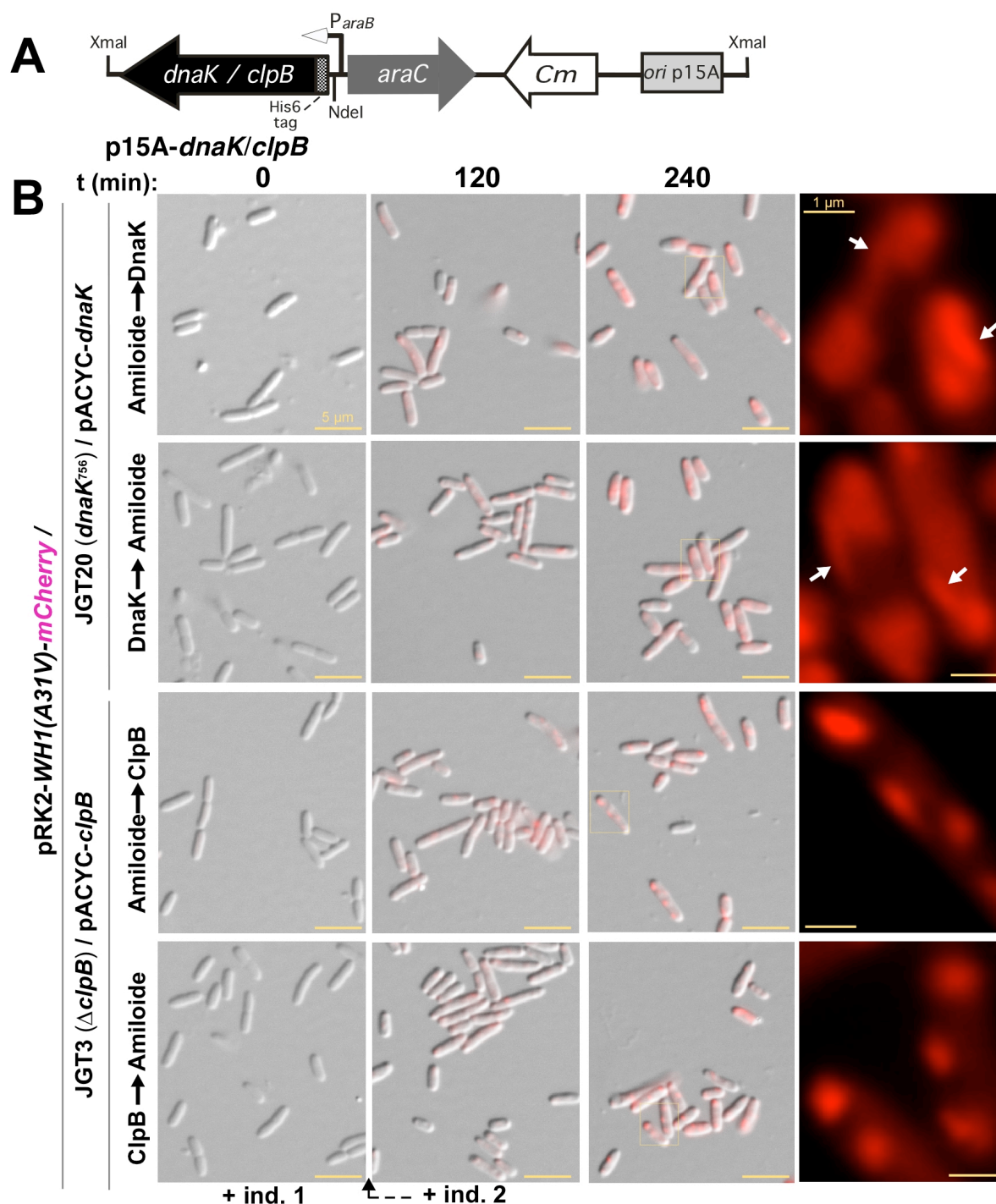
#### ii. Complementación con DnaK y ClpB

Los genes *dnaK* y *clpB* se clonaron en el vector p15A, compatible con el vector de expresión pRK2 y que posee un número de copias moderado (13-39 por célula), cuya regulación está bajo un promotor inducible por arabinosa (**Figura 22.A**). Además, la clonación de los genes se diseñó de modo que se fusionó en sus extremos N-terminales una etiqueta de 6 histidinas, epítipo que también posee RepA-WH1(A31V).

Los ensayos de complementación, en los que se sobreexpresa RepA-WH1(A31V) junto con la chaperona correspondiente a la estirpe deficiente, se realizaron tras calibrar previamente las concentraciones de Ara y de IPTG a través de la cuantificación por *Western blot* de la etiqueta de 6 histidinas. De esta manera se consigue una expresión aproximadamente equimolar del prionoide RepA-WH1(A31V) y de las chaperonas durante la primera mitad del experimento (0.5-2 horas), mientras que se duplican las moléculas de chaperona con respecto a las de prionoide a partir de la segunda mitad (2-4 horas) (**Figura 23.B**). Por otro lado, también se probaron distintos órdenes de adición secuencial de cada inductor (con un intervalo de 30 minutos). Así se pretendía



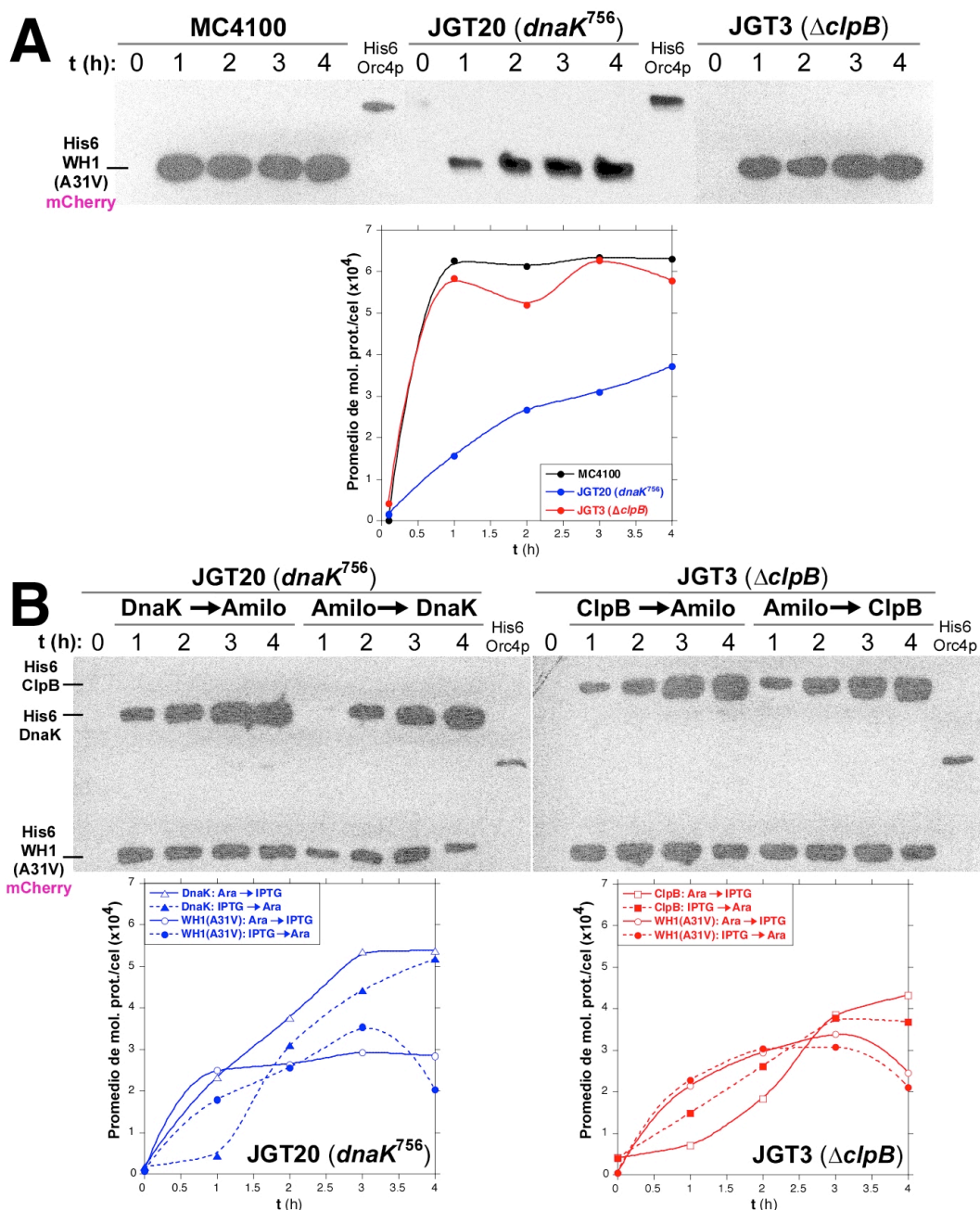
comprobar si la expresión previa de las chaperonas o del prionoide tenía algún efecto sobre los agregados finalmente formados.



**Figura 22.** Expresión del amiloide RepA-WH1(A31V)-mCherry en las estirpes deficientes para chaperonas (JGT20, JGT3). (A) Esquema lineal (no dibujado a escala) del vector p15A utilizado para expresar las chaperonas DnaK o ClpB. Este plásmido es compatible con el pRK2-WH1(A31V), ambos están basados en replicones de bajo y moderado número de copias (RK2-*trfA* y p15A), distintos marcadores de resistencia a antibióticos (ampicilina-Ap y cloranfenicol-CM) y los promotores inducibles independientes *P<sub>tac</sub>* y *P<sub>araB</sub>*, incluyendo los genes que codifican los respectivos represores (LacI<sup>q</sup> y AraC). (B) Los inductores IPTG y Ara se añadieron en ambos órdenes (+ind.1 → +ind.2) con un intervalo de tiempo de 30 minutos. Se sobreexpresaron primero el *prionoide* (Amilo → DnaK/ClpB) o la chaperona (DnaK/ClpB → Amilo). La chaperona Hsp70 desorganiza parcialmente las partículas amiloides globulares generando agregados difusos y elongados (se indican con flechas).

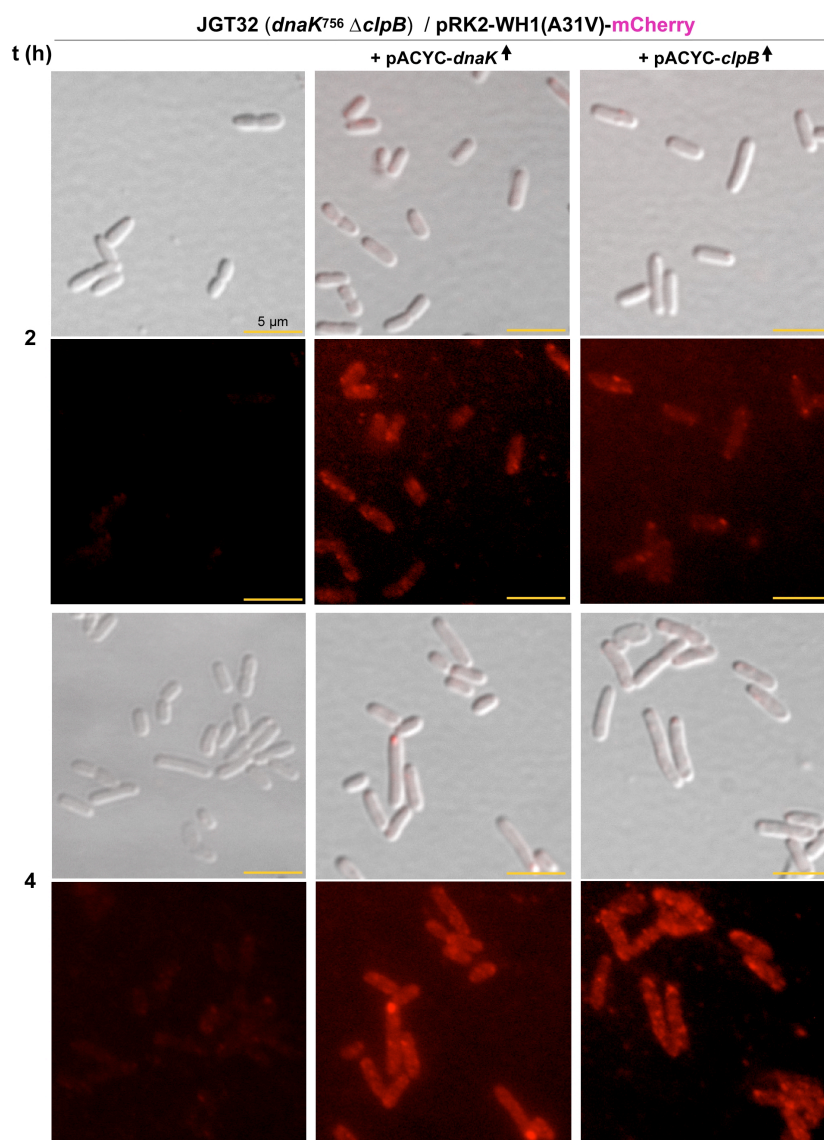
Primeramente, cabe destacar que la sobreexpresión de DnaK recuperó enteramente el fenotipo que manifestaban las células *dnaK756* (**Figura 22.B**), restableciéndose en el 40% de células el tamaño normal y la no formación de filamentos (**Figura 25.B**). Por otro lado, aumentó hasta un 90% la población de células que poseían inclusiones. La complementación con ClpB en células con fondo  $\Delta clpB$  provocó un ligero aumento en el tamaño celular y en la proporción de células que portan inclusiones. Como controles, la expresión de las chaperonas en la estirpe WT de *E. coli* (MC4100) no tuvo mayor efecto y la expresión de RepA-WH1(A31V) en una estirpe doble mutante para DnaK y ClpB (*dnaK756*  $\Delta clpB$ ) dio lugar a una sustancial reducción en la formación y transmisión de los agregados fluorescentes. Finalmente, este fenotipo revirtió con la complementación de una u otra chaperona (**Figura 24**).

El mayor efecto se observó con la complementación de DnaK: se produjo un cambio en la apariencia de los agregados RepA-WH1(A31V), que adquirieron aspecto elongado o difuso que se asemejaba a la forma de un “cometa”. Esta estructura aparecía en un 70-95% de las células (**Figura 25.C**). Esto sugiere que las partículas sufren una desorganización por la acción directa de DnaK. Por su parte, la sobreexpresión de ClpB dio lugar a partículas fluorescentes con aspecto de hallarse altamente compactadas (**Figura 22**) en un 75-95% de las células. Este porcentaje era similar al observado en la estirpe con fondo genético silvestre (**Figura 25.C**). Finalmente, no se apreció dependencia en los fenotipos del orden de expresión del prionoide y de cada una de las chaperonas.



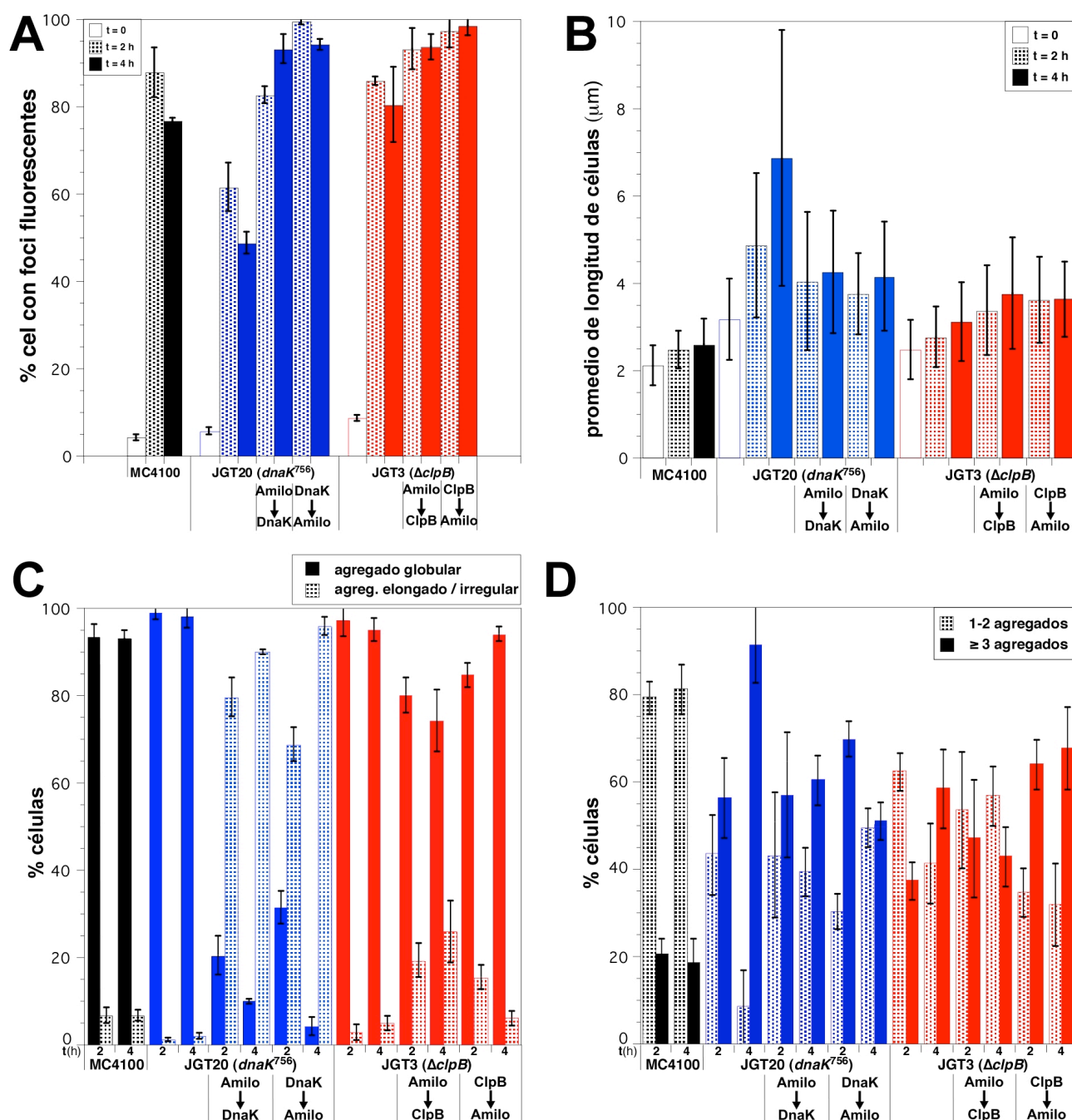
**Figura 23.** Análisis cuantitativo de la expresión de WH1(A31V) (A) y de DnaK y ClpB (B) mediante *Western blot* usando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo de histidinas localizadas en el extremo N-terminal que poseen las tres proteínas. Se ha representado la media estimada del número de moléculas de proteína por célula a lo largo del tiempo de inducción.





**Figura 24.** Expresión de RepA-WH1(A31V) en la estirpe doble mutante JGT32 (*dnaK*<sup>756</sup> y  $\Delta$ *clpB*). A la izquierda, imágenes de cultivos inducidos de bacterias que portan el vector de expresión RepA-WH1(A31V). En los paneles centrales y derecha, cuando se complementó con los vectores de expresión que portan las chaperonas DnaK o ClpB, que fueron inducidos y procesados a los intervalos de tiempo indicados, tal y como se describe en la sección de **Materiales y Métodos**. La complementación con una u otra chaperona causa la aparición de corpúsculos fluorescentes (agregados).

En cuanto al número de agregados por célula (**Figura 25.D**) la clase más abundante para las células MC4100 y  $\Delta$ *clpB* era la de 2 agregados característicos en posición axial  $\frac{1}{4}$  y  $\frac{3}{4}$  (en un 50-60%). Mientras que para las células con fondo *dnaK*<sup>756</sup>, la más abundante correspondió a múltiples agregados (3 o más) por célula, efecto debido en parte al mayor tamaño de las células en esta estirpe. La sobreexpresión de una u otra chaperona incrementó la proporción de células con 3 o más agregados en un 50-70%, aunque la naturaleza difusa de las partículas cuando DnaK es la chaperona estudiada hizo difícil el precisarlo.



**Figura 25.** Gráficas de las cuantificaciones de células de *E. coli* en tres experimentos independientes llevados a cabo bajo las condiciones del ensayo de las Figuras 21 y 22 (A) Porcentaje de células que contienen focos rojos fluorescentes. (B) Tamaño promedio de las células. (C) Proporción de las células que contienen agregados globulares o elongados/de forma irregular. (D) Distribución del número de agregados por célula. El muestreo se realizó sobre células recolectadas a tiempos de inducción de 0, 2 y 4 horas. Al menos 100 células se contaron para cada tipo y clase. Las barras de error representan la desviación estándar de los valores medios, representados en forma de histograma (barras).

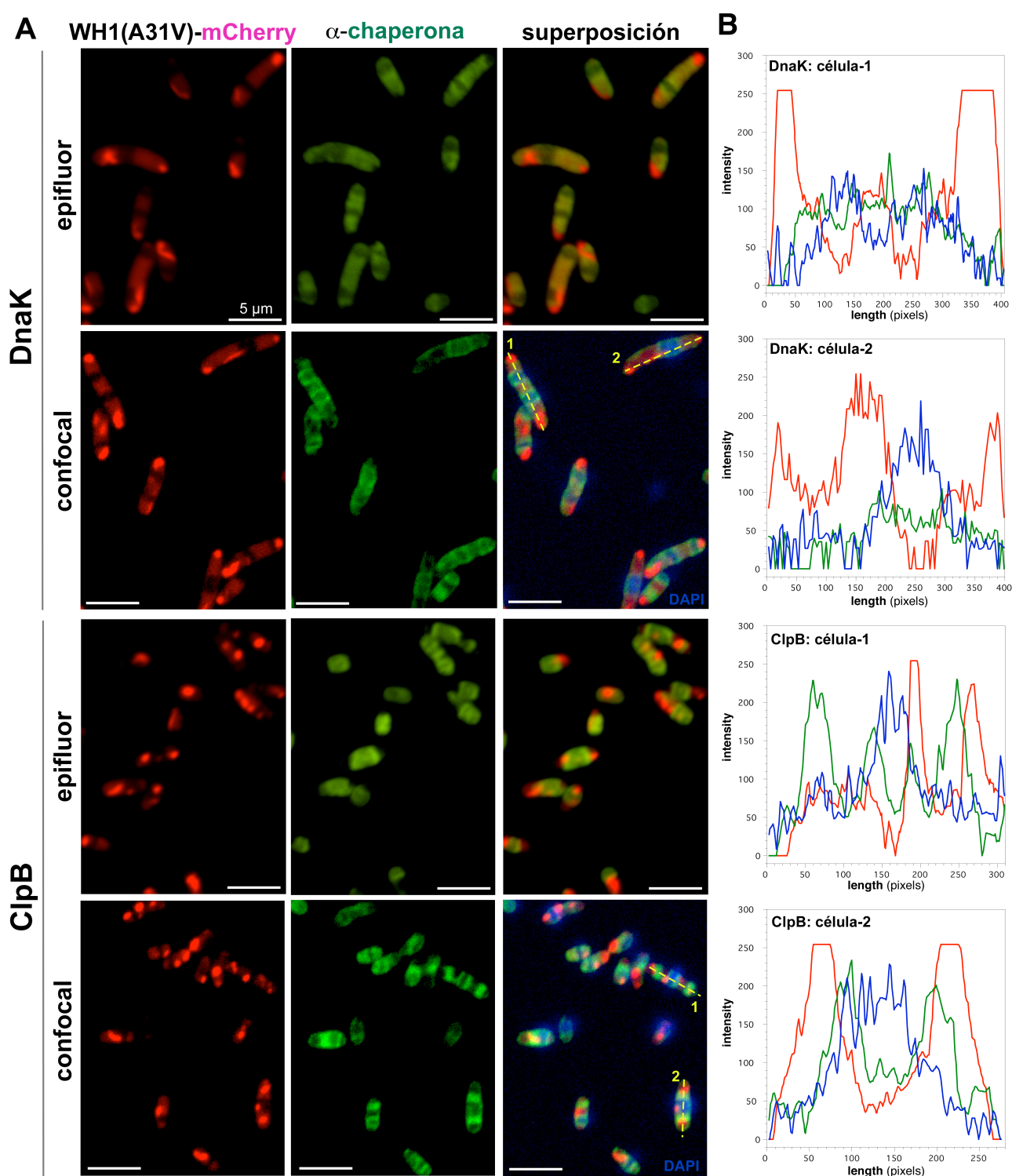
## 2.2. DnaK genera oligómeros transmisibles verticalmente

### 2.2.1. Microscopía confocal y electrónica de transmisión

Para explorar con más detalle la acción de las chaperonas sobre los agregados RepA-WH1 (A31V)-mCherry se llevó a cabo la inmuno-localización de las mismas en células que expresaban

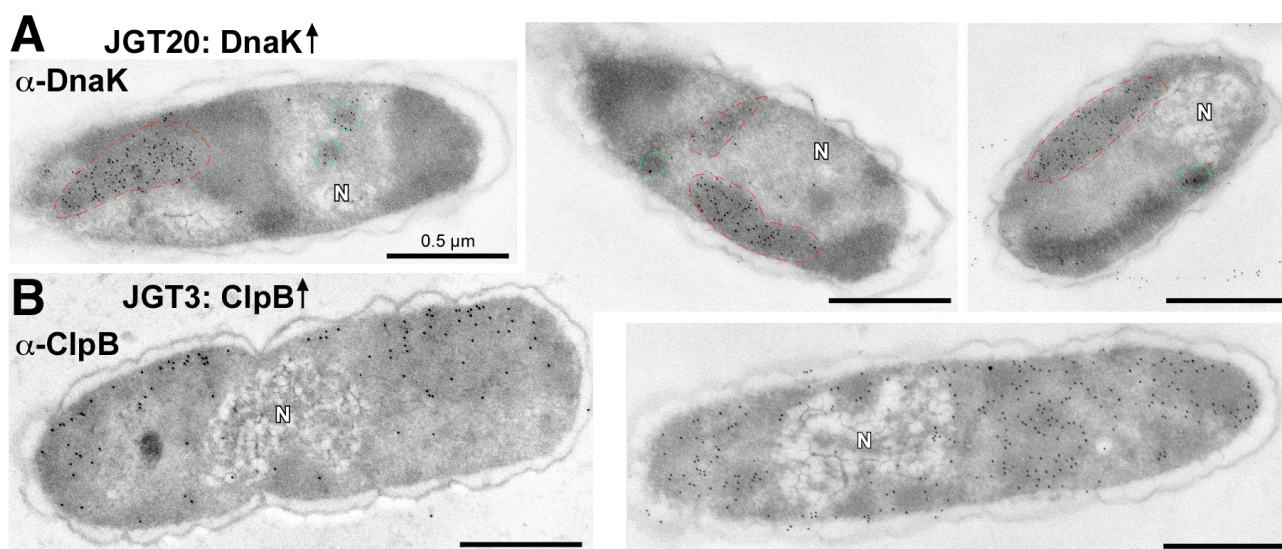
el prionoide junto con las distintas chaperonas y, posteriormente, se visualizaron mediante microscopía confocal (**Figura 26**) y microscopía electrónica de transmisión (**Figura 27**). Las imágenes obtenidas por microscopía confocal precisaron que el nucleoide y las partículas amiloides grandes de RepA-WH1(A31V) se excluyen mutuamente, un fenómeno determinado por la disipación de entropía por los grandes ensamblajes intracelulares (Jun y Wright, 2010). Las inclusiones de mayor tamaño tenían localización subpolar, mientras que las globulares más pequeñas estaban dispersas en el citoplasma. Ni la chaperona DnaK, ni la disgregasa ClpB colocalizaban significativamente con el nucleoide o con los grandes agregados. ClpB se localizaba intercalada y, en cierta medida, alrededor de los agregados, mientras que DnaK parecía agrupada colocalizando con las partículas agregadas pequeñas (**Figura 26**).

La microscopía electrónica de transmisión confirmó este patrón de distribución. Viendo en detalle las imágenes de la estirpe *dnaK756* complementada mediante la expresión de DnaK, se apreció que junto a los agregados grandes, irregulares y electrodensos de RepA-WH1(A31V) se identificaron partículas con forma elipsoide que presentaban una intensidad de contraste distintiva. Este fenómeno podría reflejar un empaquetamiento diferencial en una subpoblación de agregados RepA-WH1(A31V). Además, las moléculas de DnaK colocalizaban preferencialmente en estas regiones (**Figura 27**). Por el contrario, ClpB se distribuía a lo largo del citoplasma de modo relativamente homogéneo.



**Figura 26.** Distribución intracelular de RepA-WH1(A31V)-mCherry y de las chaperonas DnaK/ClpB analizada a través de microscopía de epifluorescencia y confocal. (A) La complementación en las estirpes *dnaK756* y  $\Delta clpB$  se llevó a cabo mediante la sobreexpresión de las chaperonas DnaK y ClpB, respectivamente, añadiendo de manera consecutiva Ara e IPTG (**Figura 22**). La señal endógena mCherry (rojo) y la extrínseca (verde), ésta a través del inmuno-marcaje fluorescente, localizan el *prionoide* y las chaperonas, respectivamente. También se realizó el marcaje del ADN con DAPI. (B) Los canales de color (RGB) están representados a través de secciones longitudinales (líneas amarillas discontinuas) de células (1 y 2), que expresan chaperonas. El perfil parece mostrar una distribución excluyente de los agregados de RepA (rojo) y nucleóide (azul) y una disposición heterogénea de DnaK y ClpB a lo largo de la célula, sin colocalizar con los grandes agregados globulares.

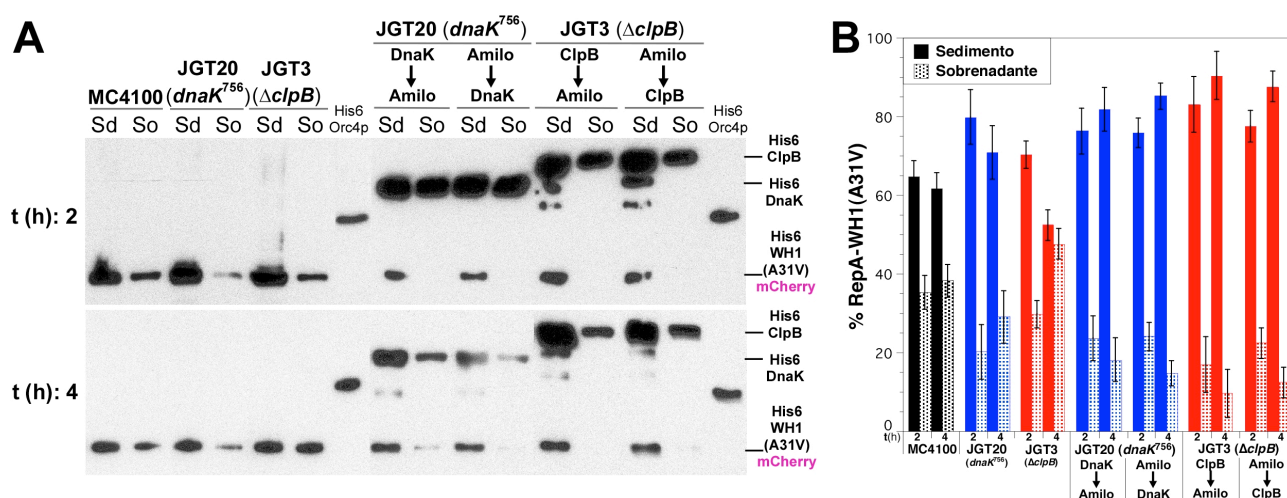




**Figura 27.** Complejos entre RepA-WH1(A31V)-mCherry y DnaK/ClpB mostrados mediante iEM. Secciones finas de células que contienen agregados RepA-WH1(A31V), complementadas con DnaK (arriba) y ClpB (abajo), se incubaron con anticuerpos específicos contra las chaperonas y después se localizaron con anticuerpos secundarios conjugados con oro (puntos). Es en las partículas agregadas elongadas o pequeñas donde se concentra el marcaje anti-DnaK. Esta región está marcada en rojo y resulta menos electrondensa que las grandes inclusiones subpolares. ClpB se encuentra distribuida por todo el citoplasma. N: nucleóide.

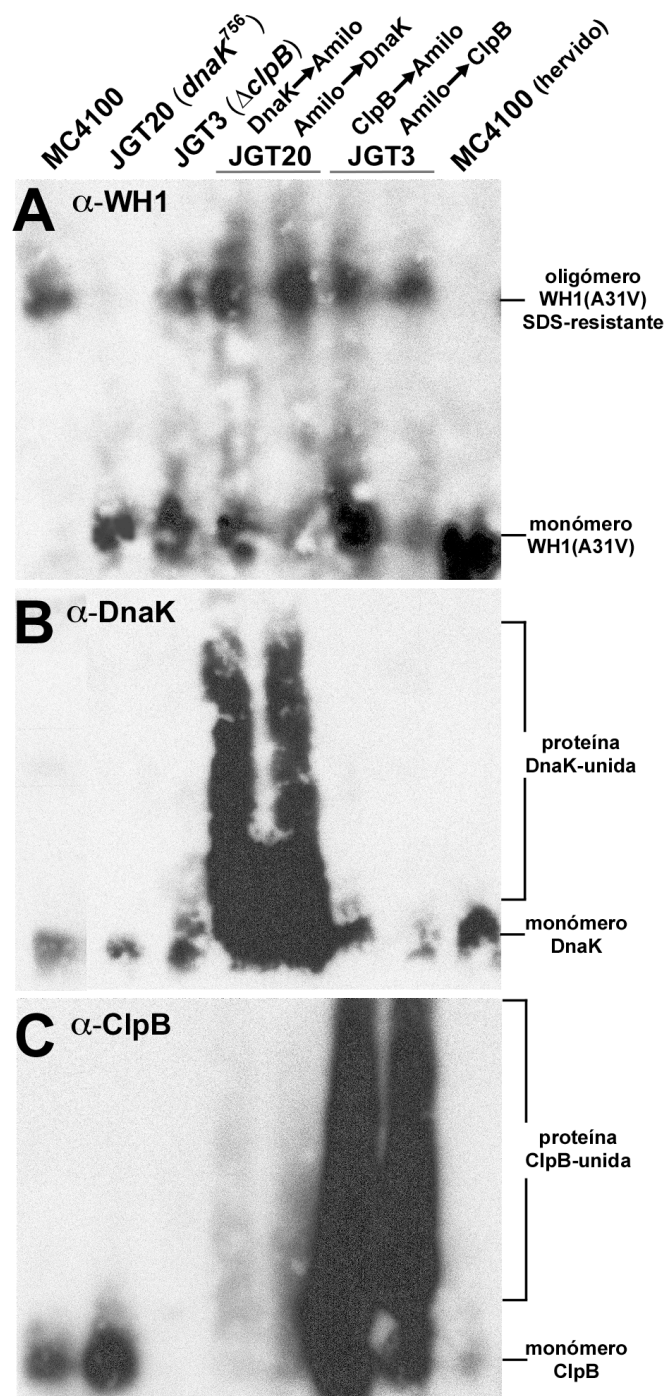
### 2.2.2. Caracterización bioquímica de los agregados

Para caracterizar la naturaleza de los agregados RepA-WH1(A31V), se ha caracterizado la distribución de RepA-WH1(A31V) entre la fracción soluble o agregada de extractos celulares de las tres estirpes estudiadas, bajo las mismas condiciones que en los ensayos *in vivo*. Para realizar el fraccionamiento, se centrifugaron a alta velocidad los lisados celulares, seguido de *Western blot* y visualización a través del anticuerpo anti-His de RepA-WH1 y las chaperonas DnaK/ClpB (**Figura 28.A**). Se observó que la mayor parte del prionoide RepA-WH1(A31V) se encuentra en la fracción insoluble ( $\geq 60\%$ ). Esta tendencia se hizo más evidente en la estirpe con fondo Hsp70-deficiente (*dnaK756*), donde la fracción agregada aumentaban a un 80% (**Figura 28.B**). Cuando DnaK o ClpB se sobreexpresaron, una cantidad importante de DnaK y de ClpB se dirigió a la fracción agregada, el 50% a las 2 horas y el 75% a las 4h, mientras que su presencia en el sedimento de RepA-WH1 no varió significativamente (**Figura 28.B**).



**Figura 28.** Distribución de la fracción agregada (Sd-sedimento) y soluble (So-sobrenadante) de las proteínas RepA-WH1(A31V)-mCherry, DnaK y ClpB, marcadas a través de la etiqueta de 6His, tras la sedimentación (16000 rpm, durante 30 minutos a 4°C) de los extractos celulares de las estirpes bacterianas cultivadas bajo las condiciones especificadas (ver **Figura 21** y **22**). (A) Análisis por *Western blot*. (B) Representación en histograma del porcentaje de proteína WH1(A31V) en cada fracción tras 2 y 4 horas de inducción. Las barras representan la desviación estándar de dos medidas independientes.

El ensayo de electroforesis en geles de agarosa en condiciones semi-desnaturalizantes (SDD-AGE) permite, a partir de muestras de proteínas sin hervir, la separación de las especies monoméricas y oligoméricas-agregadas, llegando incluso a resolver especies con pesos moleculares que rondan los MDa (Bagriantsev y col., 2006). Cuando los extractos totales de *E. coli* ensayados se separaron electroforéticamente por SDD-AGE (**Figura 29**), se hizo evidente que en la estirpe WT (MC4100) existía una fracción oligomérica mayoritaria resistente al detergente. Estos oligómeros desaparecieron completamente en la estirpe *dnaK*<sup>756</sup>, mientras que en los extractos de la estirpe  $\Delta$ *clpB* disminuyeron su proporción. La complementación con la expresión de DnaK en *dnaK*<sup>756</sup> dio lugar a la recuperación de la fracción oligomérica de RepA-WH1(A31V) resistente al detergente, así como la complementación con ClpB en  $\Delta$ *clpB* también aumentó ligeramente dicha fracción. Aunque los complejos RepA-WH1(A31V)-DnaK se pueden observar al microscopio electrónico (María Moreno, comunicación personal), la interacción entre ambos debe de ser débil por lo que serían disgregadas por el detergente durante la electroforesis y DnaK se visualizó como una banda que migró como se esperaba del monómero (**Figura 29**). Esto también parecía ocurrir en el caso de la disgregasa ClpB. La sobreexpresión de DnaK o ClpB generó un gran rastro de proteína, unida a otras en el extracto celular, quizás debido a la elevada cantidad de moléculas cargadas.



**Figura 29.** Caracterización de los oligómeros RepA-WH1(A31V) en *E. coli* por SDD-AGE y su dependencia de las chaperonas DnaK/ClpB. Los extractos totales de las estirpes WT y DnaK/ClpB-deficientes, complementadas o no con la expresión de estas chaperonas, se analizaron por electroforesis en geles de agarosa en condiciones semi-desnaturalizantes. La distribución de RepA-WH1(A31V)-mCherry (A), DnaK (B) y ClpB (C) fue revelada por *Western blot* con los anticuerpos específicos indicados. La presencia de oligómeros RepA-WH1(A31V) resistentes a detergente es directamente dependiente de la chaperona Hsp70 (DnaK), pero no de la disgregasa Hsp104 (ClpB).

Estos resultados sugieren un papel directo de la chaperona Hsp-70 en la modulación de la agregación del prionoide, generando partículas transmisibles identificables con los propagones amiloides descritos en levaduras (Tuite y Serio, 2010).

### 3. APROXIMACIÓN A LA DINÁMICA DE LA AMILOIDOGÉNESIS A TRAVÉS DE MICROFLUÍDICA

La realización de esta sección del trabajo ha sido posible gracias a una estancia de 5 meses llevada a cabo en el laboratorio del Dr. Ariel Lindner en el Centro de Investigación Interdisciplinar (CRI) en París.

#### 3.1. Propagación del *prionoide* RepA-WH1

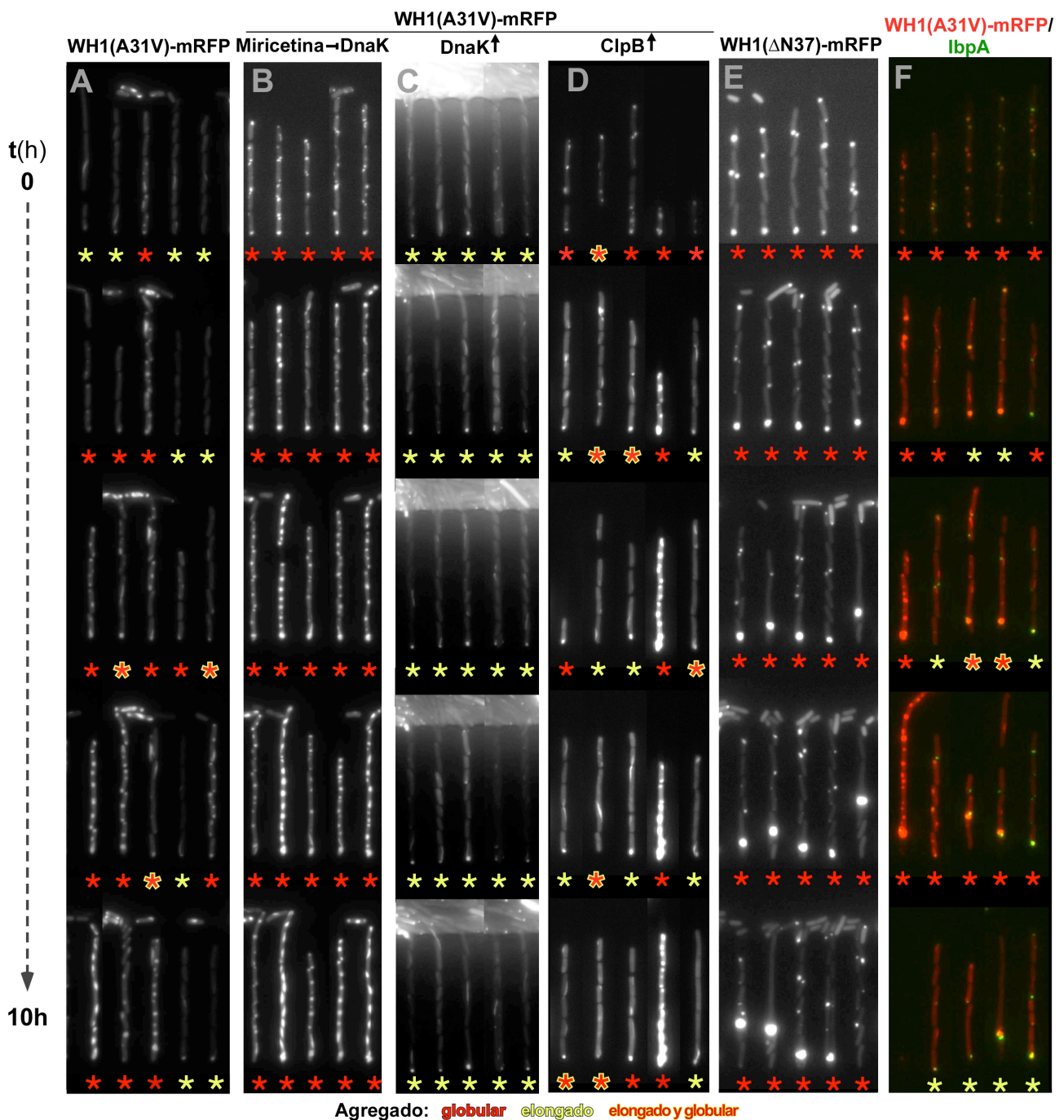
La introducción del módulo de expresión *P<sub>tac</sub> repA-WH1-mCherry*, más el represor *lacI<sup>q</sup>* en el cromosoma de *E. coli* MG1655 ha permitido trabajar en condiciones de monocopia más regulables, y por ello más fisiológicas, y estudiar la dinámica intracelular y la propagación del prionoide gracias al marcador fluorescente mCherry. En este contexto, el empleo de una herramienta microfluídica (Vyawahare y col., 2010) ha permitido evaluar la transmisión y toxicidad de los agregados amiloides RepA-WH1 de las células madres y su progenie de manera individual, siguiendo la división célula a célula durante cientos de generaciones. Partiendo de un cultivo puro e isogénico, las células colonizan los canales de crecimiento y se depositan en el fondo de los mismos, actuando así como células madres fundadoras. Tras dividirse, desplazan a las células hijas hacia el canal principal, a través del cuál el flujo continuo hace posible la distribución de nutrientes y moléculas reguladoras o inhibidoras (Wang y col., 2010c). Una descripción detallada del dispositivo de flujo se encuentra en la sección de **Materiales y Métodos (Figura 13)**

La primera característica destacable fue la aparición de dos tipos de agregados RepA-WH1 (A31V), globulares y elongados (con forma de “cometa” o “gusano”), que recuerdan a los mostrados en la **Figura 22, 27**. Estas partículas aparecieron segregadas en células que se encontraban en canales contiguos (**Película S2.A, Figura 30.A**). En segundo lugar, como cabía esperar de su condición de elementos epigenéticos, cada tipo de partícula generó un fenotipo diferente en cuanto al crecimiento y división celular bacteriana.

Las inclusiones globulares/esféricas, que pueden ser de distintos tamaños y variar su número por célula, expandían el tiempo de generación, si se comparaban con la división de células que transitoriamente no poseían agregados. Las partículas fluorescentes, por coalescencia de varios agregados y/o aumento de volumen por deposición de más moléculas RepA-WH1, adquirirían un tamaño tal que bloqueaban el septo de división impidiendo la citoquinesis (Fernández-Tresguerres y col., 2010). Si finalmente se resolvía de manera asimétrica la herencia de la partícula continuaba la división, pero si éstas no eran resueltas o disgregadas, se producía filamentación celular que, junto con la oclusión causada por el nucleoide, conducían finalmente a la quiescencia por detención del crecimiento. Este compendio de rasgos es síntoma de envejecimiento y toxicidad (Lindner y col., 2008; Fernández-Tresguerres y col., 2010; Winkler y



col., 2010). Las células filamentaban de tal manera que escapaban a menudo de los canales, que quedaban vacíos. Se pudo observar que en la célula madre fundadora yacían inclusiones esféricas de gran tamaño, que predominantemente se localizaban en el polo viejo. Probablemente poseen mayor volumen que las inclusiones en las células hijas por la continua producción y acumulación, con el transcurso del tiempo, de la proteína amiloide, ya que dicho polo no se renueva (Stewart y col., 2005). Incluso con cierta frecuencia, la célula madre que expresa un tipo de agregado puede en un momento dado pasar a generar el otro, siendo más frecuente la conversión desde células generadoras de agregados elongados a globulares que la contraria.



**Figura 30.** Imágenes capturadas del crecimiento de *E. coli* MG1655 expresando RepA-WH1(A31V) en el dispositivo de canales microfluídicos. Evolución a lo largo de 10 horas de la proliferación de MG1655 sobreexpresando el *prionoide* RepA-WH1(A31V) (A), o sobreexpresándolo bajo inhibición de DnaK por miricetina (B) o junto con DnaK (C), o ClpB (D) o expresando la versión mutante RepA-WH1( $\Delta$ N37) (E) y por último, colocalización de RepA-WH1 con IbpA (GFP) (F). La inducción de RepA-WH1(A31V/ $\Delta$ N37), ClpB y DnaK se realizó tras la inyección de las células en los microcanales. El seguimiento de las partículas RepA-WH1 se realizó gracias a la fluorescencia intrínseca de la fusión mCherry. En el ensayo de colocalización del *prionoide* (en rojo) con IbpA (en verde, gracias a la GFP fusionada). Debajo de cada microcanal se indica la presencia predominante de agregados del tipo elongado (amarillo) o globular (rojo) o de ambos tipos coexistiendo en el mismo canal (rojo-amarillo).

Por otro lado, las partículas elongadas permitían la división durante decenas de generaciones, de modo que no afectaban significativamente al crecimiento, apareciendo tanto de *novo* como por escisión del núcleo fundador. Además experimentaban la aparición-desaparición periódica, tanto en las células madre como en las hijas, como si sufrieran ciclos de nucleación-disgregación.

### 3.2. Cofactores involucrados en la amiloidosis de RepA-WH1

La activa interconversión entre agregados observada planteó qué factores celulares podían estar involucrados en la dinámica del prionoide *in vivo*. Se decidió estudiar el posible efecto de las chaperonas DnaK y ClpB en la amiloidogénesis. Para ello se clonaron los genes *dnaK* o *clpB* en el plásmido p15A y se sobreexpresaron por inducción con arabinosa. Estos genes están pues localizados en *trans* con respecto al prionoide integrado en el cromosoma.

La sobreexpresión de DnaK provocó una clara disminución de los focos fluorescentes del tipo globular en favor de partículas elongadas (**Película S2.C**) y conllevó que fueran predominantes en todas las células de los canales (**Figura 30.C**). Por el contrario, la inhibición de DnaK mediada por miricetina, una molécula polifenólica que se une al dominio ATPásico de DnaK inhibiendo su interacción con la cochaperona DnaJ (Chang y col., 2011), aumentó las inclusiones esféricas (**Película S2.B**), siendo entonces la especie mayoritaria en todas las células (**Figura 30.B**). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio sobre el papel de la chaperona DnaK en la propagación del prionoide (ver apartado anterior): esta chaperona Hsp70 contribuye a la generación de oligómeros, pequeñas partículas que se transmitirían de célula madre a célula hija y serían las responsables de la propagación de la amiloidosis.

Por otro lado, la sobreexpresión de ClpB no parecía alterar la distribución del porcentaje promedio de los agregados globulares y elongados, ni la dinámica de interconversión entre ellos (**Película S2.D**, **Figura 30.D**).

### 3.3. Naturaleza de los agregados RepA-WH1

Se ha querido identificar si los agregados intracelulares observados difieren de los de cuerpos de inclusión convencionales (IBs). Con este fin, se comparó el fenotipo celular del prionoide RepA-WH1(A31V) con el de la proteína mutante RepA-WH1( $\Delta$ N37). Esta es una versión metaestable de la proteína RepA que carece de la secuencia amiloidogénica (deleción de los residuos 1-37 en WH1) y del dominio C-terminal WH2 (residuos 133-230), caracterizada previamente en nuestro grupo por agregar en forma de cuerpos de inclusión (Giraldo y col., 1998), por lo que es ideal para caracterizar comparativamente la naturaleza del prionoide.

Se pudo observar que los agregados de RepA-WH1( $\Delta$ N37) diferían de las partículas del prionoide en cuanto a forma, pues todos los agregados eran del tipo globular y se manifestaban con tamaño uniforme, excepto en la célula madre fundadora en la que la inclusión se acumula y se retiene, adquiriendo un volumen extraordinario. Además, se hallaba una sola inclusión por célula y en posición subpolar (Lindner y col., 2008) (**Figura 30.E**). Asimismo, los agregados RepA-WH1 ( $\Delta$ N37) no poseían la dinámica de los agregados prionoides, ni afectaban a la forma celular bacteriana. RepA-WH1( $\Delta$ N37) genera pues agregados similares a los cuerpos de inclusión convencionales, que no alteran significativamente la tasa de división celular (Lindner y col., 2008; Winkler y col., 2010) (**Película S2.E**), distinguiéndose así claramente, de los agregados amiloides de RepA-WH1(A31V).

En esta dirección se ha estudiado la colocalización de RepA-WH1-mCherry con la proteína IbpA (*Inclusion body protein A*), que es una chaperona de pequeño tamaño que se localiza en los cuerpos de inclusión (Allen y col., 1992). Se puede observar que IbpA colocalizaba solamente con la superficie de la inclusión grande de la célula madre fundadora y que no lo hace en absoluto con los agregados elongados, ni con las inclusiones globulares (pequeñas y grandes) (**Película S2.E**) (**Figura 30.E**). Este resultado permite concluir que la naturaleza del prionoide difiere de la de los cuerpos de inclusión. Esto se puede relacionar con el hecho de que la sobreexpresión de ClpB no afecte en absoluto a la dinámica y características del prionoide, ya que es ClpB la chaperona que interviene en el desensamblaje de los cuerpos de inclusión (Carrió y Villaverde, 2005).

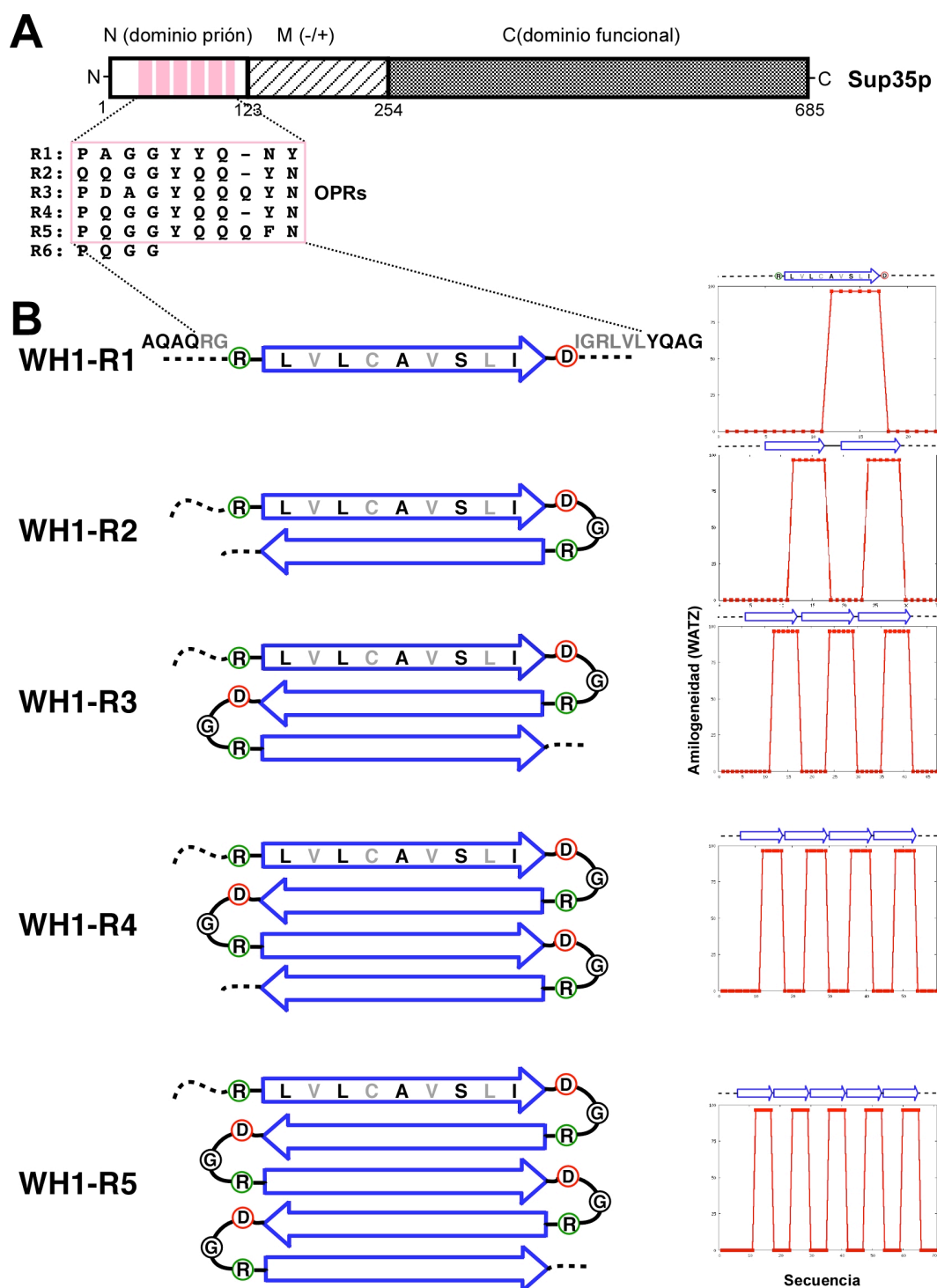
Finalmente, la ausencia de actuación de ClpB sobre el prionoide bacteriano, sugiere que la propagación del prionoide RepA-WH1 en bacterias difiere de la de levaduras, cuya disgregasa homóloga (Hsp104) que está claramente involucrada en la producción de propagones en levaduras, mientras que en el prionoide esa función parece estar ejercida por DnaK (Hsp70).

## 4. PROPAGACIÓN DEL PRION Sup35\_RepA-WH1p EN *S. cerevisiae*

### 4.1. Mantenimiento del prion [*PSI*<sup>+</sup>] en las quimeras Sup35\_WH1-Rp [*REP-PSI*<sup>+</sup>]

#### 4.1.1. Diseño y construcción

La proteína Sup35p determina el elemento epigenético heredable, el prion  $[PS^+]$  (Wickner y col., 2007; Tessier y Lindquist, 2009; Tuite y Serio, 2010). Se ha puesto a prueba el potencial la secuencia amiloidogénica bacteriana de RepA-WH1(A31V) en la formación y mantenimiento del prion de levaduras  $[PS^+]$ . El hecho de que Sup35p posea una clara división entre los dominios que median el prion  $[PS^+]$  (PrD-N y M) y el dominio funcional esencial (C-terminal) (Ter-Avanesyan y col., 1993; 1994; King y col., 1997), junto con el extenso conocimiento que se tiene de ella, hacen de Sup35p una herramienta idónea para estudiar las propiedades de agregación de secuencias heterólogas en PrD-N. Con este fin, se han sustituido varias repeticiones en la secuencia de ese dominio formador del prion de Sup35p (OPR) por expansiones de la secuencia amiloidogénica de RepA-WH1(A31V) (**Figura 31.A**) y se ha estudiado si éstas podían todavía determinar la agregación de Sup35p y con ello la nucleación la inducción de *novο* y el mantenimiento del prion de levaduras  $[PS^+]$  (Li y Lindquist, 2000; Osherovich y col., 2004).



**Figura 31.** Reconstrucción de las repeticiones amiloidogénicas WH1-R en las proteínas quiméricas Sup35\_RepA(WH1)p. (A) Dominios de la proteína Sup35p, N (aminoácidos 1-123), M (aa 124-253) y C (aa 254-685). Las regiones N y M son requeridas para la agregación de Sup35p. El dominio N, a su vez, está dividido en regiones, una rica en Q/N (QNR, aa 1-40) y la otra porta repeticiones oligopeptídicas R1-R6 (OPR, 40-97) de una secuencia consenso (recuadro). (B) Esquema del reemplazamiento de las OPR por repeticiones en tándem del péptido WH1-R (flecha) cuya estructura secundaria predicha es de hebra- $\beta$  (Giraldo, 2007). Gracias a los aminoácidos flanqueantes integrados (DGR) se generan giros- $\beta$  [favorecidos por la interacción de las cadenas laterales de carga opuesta de Aspartato (D, rojo) y Arginina (R, verde)]. Las hebras- $\beta$  se disponen en orientación antiparalela, generando una estructura de lámina- $\beta$ . A la derecha se muestra el resultado de la predicción de regiones amiloidogénicas de las repeticiones WH1-R según el algoritmo WALTZ (<http://waltz.vub.ac.be/>).

La secuencia amiloidogénica de RepA-WH1(A31V) (L<sub>26</sub>VLC<sub>AVSL</sub>I<sub>34</sub>), que denominaremos WH1R, es de naturaleza hidrofóbica, al igual que los segmentos amiloidogénicos de las proteínas de mamífero que provocan proteinopatías, mientras que la secuencia consenso que conforma las repeticiones oligopeptídicas (OPR) de Sup35p es rica en aminoácidos polares: P/Q QGGYQ Q/-YN. Las OPRs fueron reemplazadas por de 1-5 repeticiones en tándem de WH1R, a las que se añadieron en los extremos de cada WH1-R el residuo Arg N-terminal y la Asp C-terminal que flanquean a WH1R en la secuencia de RepA-WH1, así como, entre ambos residuos, el aminoácido Gly, de manera que pueden generar un giro-β entre las repeticiones y contribuyen al plegamiento de las 2-5 hebras, como una lámina-β antiparalela, que es la estructura propuesta para el ensamblaje amiloide de RepA-WH1(A31V) (Giraldo, 2007) (**Figura 31.B**). Se muestra en la **Figura 31.B** (panel derecho) una predicción del potencial amiloidogénico intrínseco de la secuencia realizada mediante el programa WALTZ.

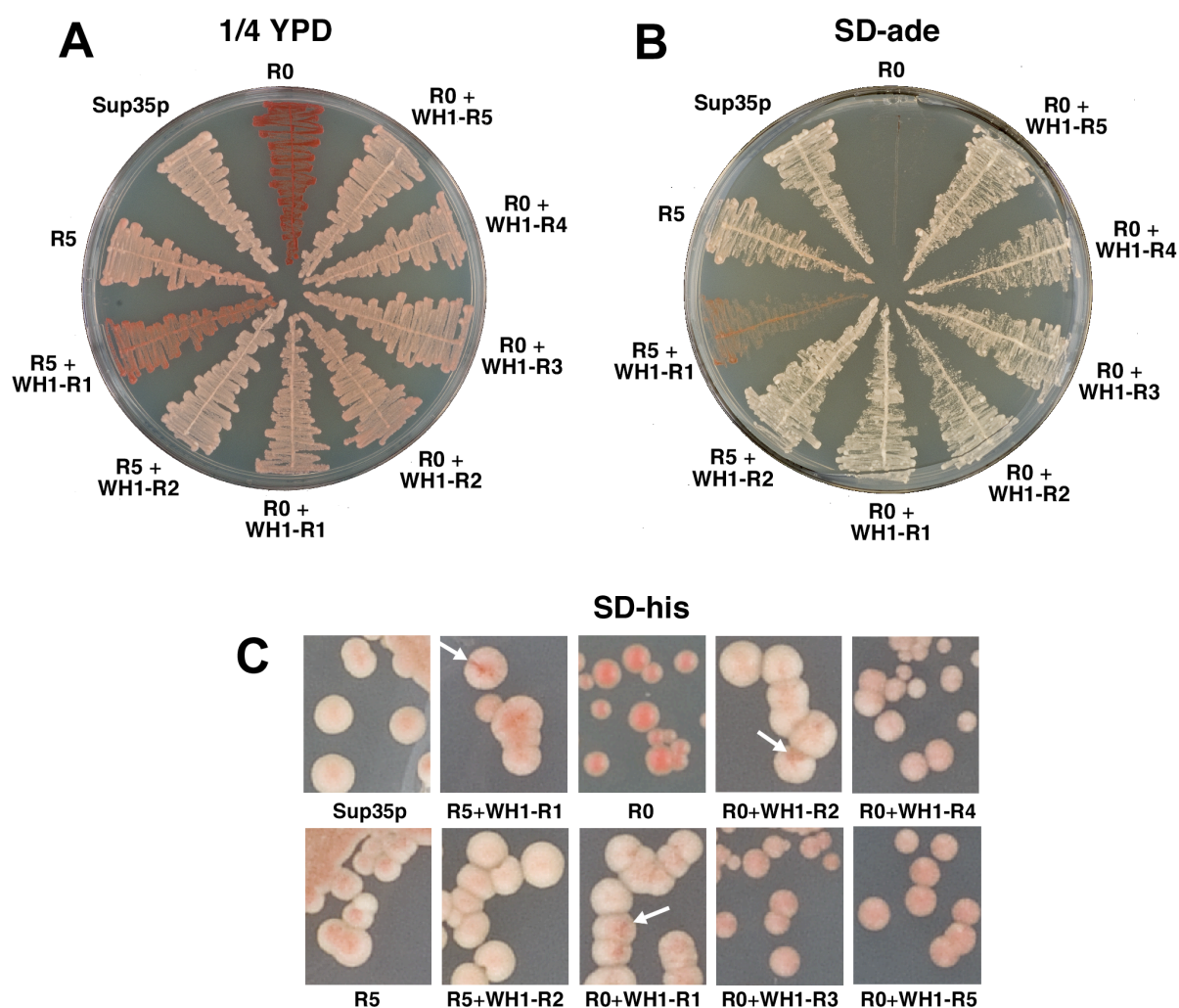
Para evaluar el potencial amiloidogénico de RepA-WH1 se empleó el ensayo estándar de mantenimiento de [*PS<sup>+</sup>*]. Para ello, se ha trabajado con la estirpe de *S. cerevisiae* 74D-694, que porta una delección de *SUP35* y una copia completa y silvestre del gen *SUP35* en el plásmido centromérico pYK810 (*URA3*). Además, el genotipo de la estirpe es *ade1-14*, un alelo que sirve de eficaz reportero de la terminación de la traducción, que se monitoriza mediante la supresión “sin sentido” de un codón de terminación UGA prematuro (Liebman y Derkatch, 1999): el codón *stop* es suprimido por el ARNt codificado por el gen *SUQ5* si la terminación de la traducción está impedida de alguna manera, como sucede tras la agregación de la proteína Sup35p (Cox y col., 1980).

Se transformó la estirpe 74D-694 con los plásmidos pUCK-Sup35\_WH1-R y a continuación se procedió a la selección (con FOA) de las células que pierden el plásmido pYK810. La selección de estirpes viables demostró que la eliminación de las repeticiones e introducción de la secuencia de origen bacteriano permitía la viabilidad celular en ausencia de Sup35p (WT) y no resultaba letal.

#### **4.1.2. Las quimeras Sup35\_WH1-Rp presentan pérdida de la función de terminación traduccional**

Utilizando el principio de coloración diferencial (asociado al nivel de supresión) (Tessier y Lindquist, 2009), se estimó el nivel de agregación de las proteínas quiméricas en la estirpe 74D-694 (*ura-*). El color de las colonias que expresaban la proteína Sup35R0p (con las OPR delecionadas) era rojo intenso, consecuencia de la terminación eficiente de la traducción (**Figura 32.A**). Por el contrario, la coloración blanca de las colonias que portaban la proteína Sup35p (WT) indicó un bajo nivel de proteína funcional libre y, por lo tanto, la lectura corrida a través del codón *stop*. Esta tonalidad sirvió de referencia de agregación de Sup35p en niveles silvestres ([*PS<sup>+</sup>*]).





**Figura 32.** Capacidad de las proteínas quiméricas Sup35\_RepA(WH1)p de mantener el determinante  $[PS^+]$  en ausencia de la síntesis endógena de la proteína silvestre Sup35p. (A) Suspensión celular de los transformantes individuales post-selección con 5'-FOA y siembra en placas de medio 1/4 YPD (para realzar y determinar el color de las colonias). (B) En medio selectivo sin adenina (SD-ade). Ambas pruebas valoran el nivel de supresión del marcador *ade1-14* asociado a la agregación de las quimeras. (C) Detalle de las colonias en medio selectivo SD-His, las flechas indican el cambio hacia una coloración parda que sufren determinadas estirpes (R0+WH1-R1, R0+WH1-R2 y R5).

La eliminación de la última repetición (R6) del dominio OPR debilitó el mantenimiento de  $[PS^+]$ , de modo que las colonias adquirieron una tonalidad rojiza (**Figura 32.A**), comportamiento ya observado en otros trabajos (Parham y col., 2001; Osherovich y col., 2004). Al sustituir R6 por dos segmentos WH1-R (R5+WH1-R2), la coloración blanca se restituyó (**Figura 32.A**). Se observó que la construcción WH1R1-Sup35R5 redujo significativamente el fenotipo  $[PS^+]$  (colonias con una tonalidad débilmente rojiza), posiblemente porque una sola repetición WH1R desestabiliza el ensamblaje de Sup35p. Por otro lado, la sustitución de todas las OPRs por una repetición de WH1 (R0+WH1-R1), era suficiente para la recuperación de una tonalidad rosada, restableciéndose así el fenotipo  $[PS^+]$ , coloración que se realizó conforme se añadieron más repeticiones de la secuencia amiloidogénica bacteriana R0+WH1-R2/R3/R4/R5, todas ellas más próximas a la tonalidad característica de Sup35p-WT (**Figura 32.A**).

El estado epigenético examinado por coloración es coherente con el fenotipo observado en el ensayo de crecimiento en medios carentes de adenina: sólo las estirpes que suprimen el codón *stop* producen una proteína Ade1p funcional y se muestran prototrofos para la adenina. El control R0p, debido a su naturaleza soluble, termina eficazmente la traducción de *ade1-14* y por lo tanto no puede crecer en ausencia de adenina. En cambio, el resto de construcciones permite la supervivencia de las levaduras, excepto, como era de esperar, la estirpe R5+WH1-R1 que daba coloración rojiza en medio rico y, consecuentemente, no era capaz de crecer en medio sin adenina (**Figura 32.B**).

Asimismo, al observar en detalle las colonias, se pudo apreciar que existía un cambio sectorial de tonalidad en RO+WH1-R1y 2 (marcado con flechas) (**Figura 32.C**). Este fenómeno sugiere que existen distintos grados de estabilidad en la agregación que se verían reflejados en la pérdida de  $[PS^+]$ , por lo que las colonias adquieren una tonalidad parduzca tras el paso de las generaciones.

## 4.2. Las fusiones Sup35\_WH1p agregan *in vivo*

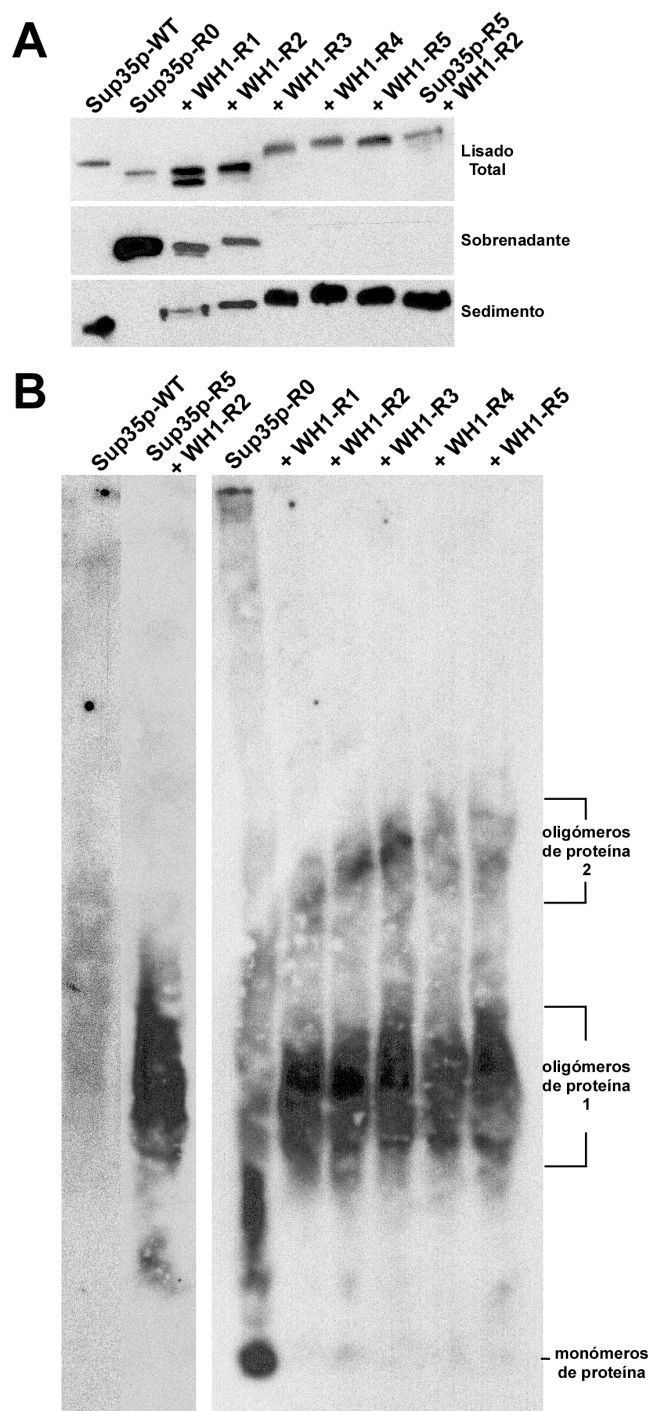
### 4.2.1. Ensayo de sedimentación

El impedimento de la terminación de la traducción podría venir dado por la inactivación funcional de Sup35p y no por la agregación. Para comprobar que las proteínas quiméricas Sup35\_WH1-Rp estaban efectivamente presentes en forma agregada en las células, se llevaron a cabo ensayos de sedimentación con los extractos celulares de cada estirpe. Estos se realizaron en la estirpe BSC783 y utilizando el vector de expresión pYeF2 (pGAL10, multicopia) (Cullin y Minvielle-Sebastia,1994), que llevaba clonados los genes quiméricos. Además, la inserción de los genes en pYeF2 supuso la incorporación del epítipo HA al extremo C-terminal de las proteínas, permitiendo así la identificación de las quimeras mediante *Western blot*. La sobreexpresión dependiente de galactosa debe favorecer la generación del fenotipo, pues la formación de amiloides es dependiente de la concentración de proteína.

Tras el lisado de las células y la comprobación de la expresión de cada proteína quimérica por *Western blot*, (se apreció un aumento gradual en el tamaño conforme se añadían repeticiones WH1-R en las quimeras (**Figura 33.A**)). Se procedió después al fraccionamiento de los extractos totales de levaduras mediante centrifugación. Como patrón de referencia se observó que la proteína Sup35p (WT) se distribuía principalmente en la fracción del sedimento, mientras que ROp se disponía en el sobrenadante. En cuanto a las quimeras, R0+WH1-R1p y R0+WH1-R2p mostraban un perfil intermedio (**Figura 33.A**), al distribuirse entre el sedimento y el sobrenadante, mientras que R5+WH1-R2p, R0+WH1-R3p, R0+WH1-R4p y R0+WH1-R5p se localizaban en el sedimento. Existe pues un comportamiento de agregación evidente, que se asemejan a la



distribución de Sup35p en la estirpe [*PS<sup>+</sup>*] (**Figura 33.A**). Estos ensayos demuestran que la introducción del péptido amiloide bacteriano RepA-WH1-R en lugar de las repeticiones originales OPR de la proteína de levaduras Sup35p restablece la capacidad de agregación de ésta como prion [*PS<sup>+</sup>*].



**Figura 33.** Las quimeras Sup35\_RepA(WH1)p producen agregados que se disponen en la fracción insoluble y son resistentes a detergentes *in vivo*. (A) Extractos celulares obtenidos a partir de la expresión de las proteínas quiméricas indicadas, que por centrifugación a alta velocidad, se localizaban en las fracciones agregada o soluble. Mientras que, tanto las proteínas Sup35p (WT) como R5+WH1-R2p, R0+WH1-R3p, R0+WH1-R4p y R0+WH1-R5p, se distribuyen exclusivamente en el sedimento, y Sup35\_ROp en el sobrenadante, R0+WH1-R1/2p se reparten entre ambas fracciones. (B) Los extractos

celulares de cada estirpe fueron separados en geles de agarosa en condiciones semi-desnaturalizantes (SDD-AGE) y la distribución de las proteínas fue detectada mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-HA. Las repeticiones WH1-R son capaces de sustituir a las de Sup35p y restaurar los complejos de alto peso molecular resistentes a detergente (oligómeros 1), perdidos al deletar la región OPR de Sup35p (R0, monómeros), incluso llegando a generar partículas de mayor tamaño (oligómeros 2) que las silvestres.

#### 4.2.2. SDD-AGE

Con el fin de caracterizar la naturaleza de los agregados detectados mediante sedimentación se han realizado ensayos de electroforesis en geles de agarosa semidesnaturalizantes (SDD-AGE). El principio de esta técnica consiste en la migración retardada de las fracciones resistentes a los detergentes (SDS o sarcosil) de las proteínas, que preservan así su estado de asociación agregado, de modo que se pueden resolver oligómeros de alto peso molecular. Como se puede observar (**Figura 33.B**), la proteína silvestre Sup35p migró generando un gran rastro difuso de baja movilidad electroforética que sugiere que los agregados (oligómeros) se distribuyen en un rango amplio de tamaños. Por el contrario, el control R0 apareció como un monómero que migraba uniformemente como una banda discreta de alta movilidad electroforética, claramente diferenciada de los oligómeros.

Las quimeras Sup35\_WH1-Rp se construyeron de modo similar al Sup35p (WT), perfilando una señal de baja movilidad electroforética difusa, resultado concordante con el obtenido en el ensayo de sedimentación, indicando que las proteínas se hallan en estado agregado. Pero cabe destacar una diferencia notable: emergen en los perfiles electroforéticos de las quimeras una subespecie de oligómeros, resistentes al detergente, con menor movilidad (mayor tamaño; oligómeros 2) (**Figura 33.B**). Por otro lado, en dichos oligómeros del tipo 2 existía una graduación creciente de tamaño conforme se expandían las repeticiones WH1R. La presencia de los agregados del tipo 2 indican que estas estirpes [*REP-PS<sup>+</sup>*] pueden generar priones quiméricos más estables (inferido de la resistencia incrementada al detergente).

### 4.3. Papel de la chaperona Hsp104 en la propagación de quimeras [*REP-PS<sup>+</sup>*]

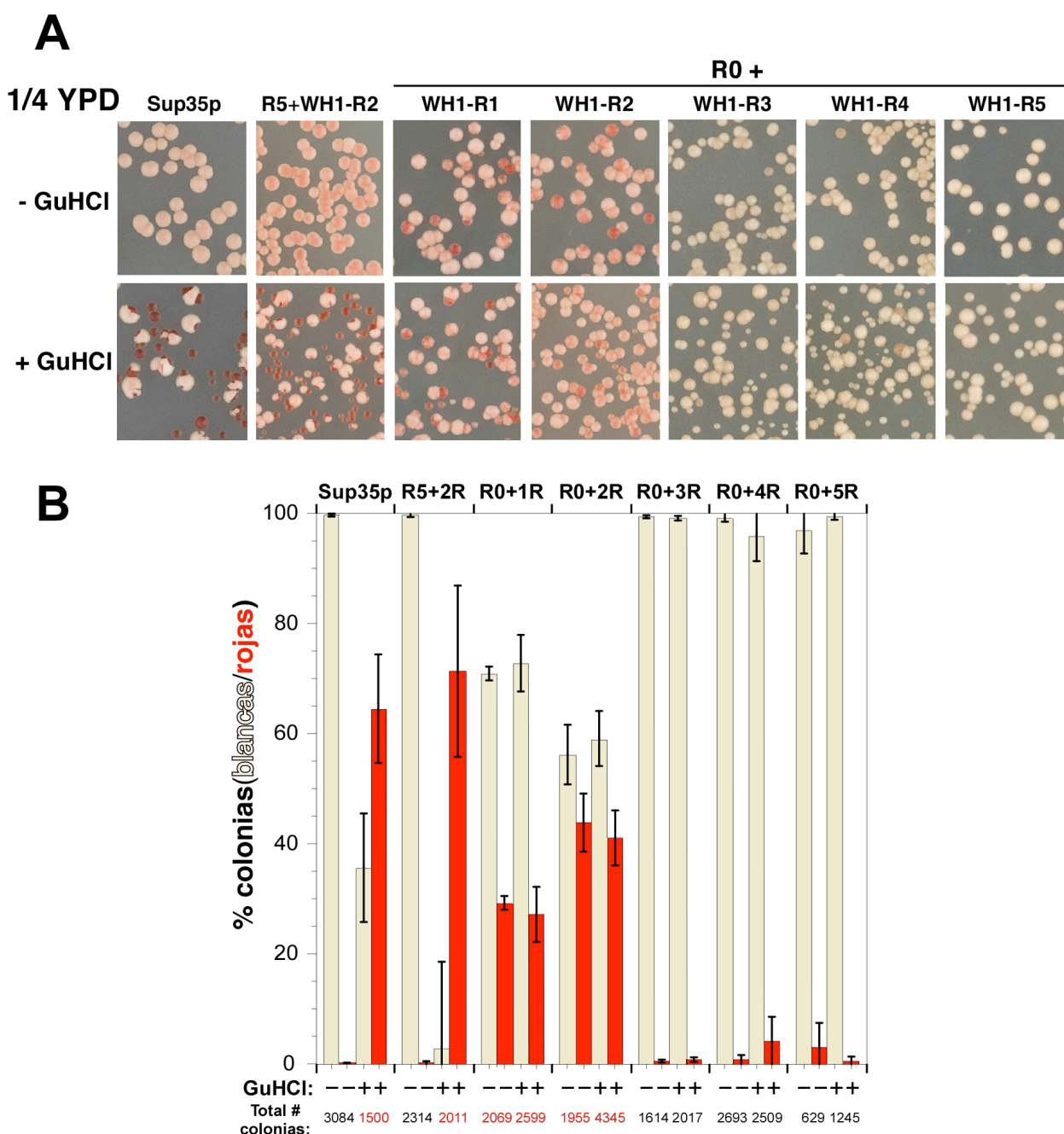
#### 4.3.1. Ensayo de inhibición de Hsp104 por guanidina

La actividad de Hsp104 puede inhibirse por concentraciones milimolares de guanidina (Gu HCl) (Ferreira y col., 2001), por lo que el crecimiento de las células [*PS<sup>+</sup>*] en presencia de guanidina produce, después de diversas generaciones, que una proporción de las células deje de mantener el prion y pasen a ser [*psi<sup>-</sup>*] (rojas), en las que Sup35p se encontrará en estado soluble. Por lo que las células habrán curado el prion (Serio y Lindquist, 2000).

La inactivación de Hsp104 por guanidina en las estirpes WT y R5+WH1-R2, tuvo como consecuencia la aparición de colonias rojas en un alto porcentaje (**Figura 34.B**); lo que indica que

en ellas se había producido la reversión de  $[PS^+]$  a  $[psi^-]$  por no poder generar Hsp104 los propagones, aunque permanezca la capacidad intrínseca de nucleación del prion.

Se apreció que, a diferencia de la estirpe WT  $[PS^+]$ , no se observó un aumento del porcentaje de colonias rojas cuando las estirpes R0+WH1-R1/R2/R3/R4/R5 se crecían en medio que contenía guanidina (**Figura 34.B**); es decir, que el estado priónico  $[PS^+]$  se mantenía. Este fenómeno sugiere que la propagación y transmisión de las proteínas quiméricas que contienen la secuencia bacteriana era independiente de Hsp104, al igual que sucede con la proteína quimérica A $\beta$ -Sup35, que porta el péptido A $\beta$  fusionado a Sup35p (von der Haar y col., 2007). Este resultado sugiere que debe de existir otro mecanismo de propagación de agregados en levaduras cuyos núcleos amiloides están formados por péptidos que no eran del tipo Q/N, quizás por medio de la participación de otra chaperona distinta de Hsp104.



**Figura 34.** El fenotipo de ganancia de función (de la lectura corrida de codones de terminación) de las quimeras Sup35\_RepA(WH1) es independiente de la acción de Hsp104. (A) Detalle de las placas de células crecidas bajo presencia de GdnHCl (panel de abajo) y libres de guanidina (panel de arriba). Se muestra la estirpe WT como referencia de alto porcentaje de curación del prión (colonias rojas) tras el tratamiento con guanidina. Esta proporción es similar para R5+WH1-R2. Mientras que R0+WH1-R3, 4 y 5 mantienen la predominancia de colonias blancas, las colonias R0+WH1-R1 y 2 son curadas (células rojas) incluso en ausencia del tratamiento con guanidina en un 30-40%, respectivamente. (B) Histograma de la cuantificación de colonias rojas y blancas de las placas del panel (A). Se indica el número de colonias contadas en cada tipo de placa (+/- guanidina) para cada estirpe.

Por último cabe destacar la frecuente (un porcentaje del 30-40%) aparición de colonias rojas en las células R0+WH1-R1 y R0+WH1-R2 en los ensayos en los que no se había añadido guanidina, (**Figura 34.A**, panel de arriba, **Figura 34.B**). Este hallazgo indica reversión de [*PSI*<sup>+</sup>] a [*psi*<sup>-</sup>] y sugiere inestabilidad en el mantenimiento del prion. La proteína Sup35p (WT), como el

resto de quimeras, preservaron la coloración blanca a lo largo de las generaciones (**Figura 34.A**, panel de arriba), produciéndose la reversión espontánea a *[psi<sup>-</sup>]* con una frecuencia muy baja.

#### 4.4. Expresión de Sup35\_WH1(R)-mCherry en *S. cerevisiae*

##### 4.4.1. La expresión de quimeras WH1(R)-Sup35(NM)p genera núcleos de agregación

Para estudiar por microscopía de fluorescencia la formación de *novο* y la transmisión intercelular del prion amiloide *in vivo*, se fusionó el dominio PrD(NM) a la proteína roja monomérica mCherry. La proteína resultante, si bien no es funcional en el ensayo de lectura corrida de codones de terminación, es capaz de recapitular por sí sola el comportamiento del prion (Tyedmers y col., 2010b). La fusión de NM a la proteína mCherry se realizó también para las versiones quiméricas R0p, R5+WH1-R2p, R0+WH1-R2p y R0+WH1-R4p. Para suministrar un sistema robusto de inducción, se clonaron los genes resultantes bajo un promotor inducible con tetraciclina (TET-ON), que permite elevar los niveles de proteína y asegurar la formación de los núcleos amiloides del prion (Wickner, 1994). Los plásmidos resultantes se transformaron en la estirpe 74DΔNM, que posee el gen *SUP35* deletado en su dominio PrD, de manera que se consigue que la Sup35p endógena sea inmune al secuestro como prión.

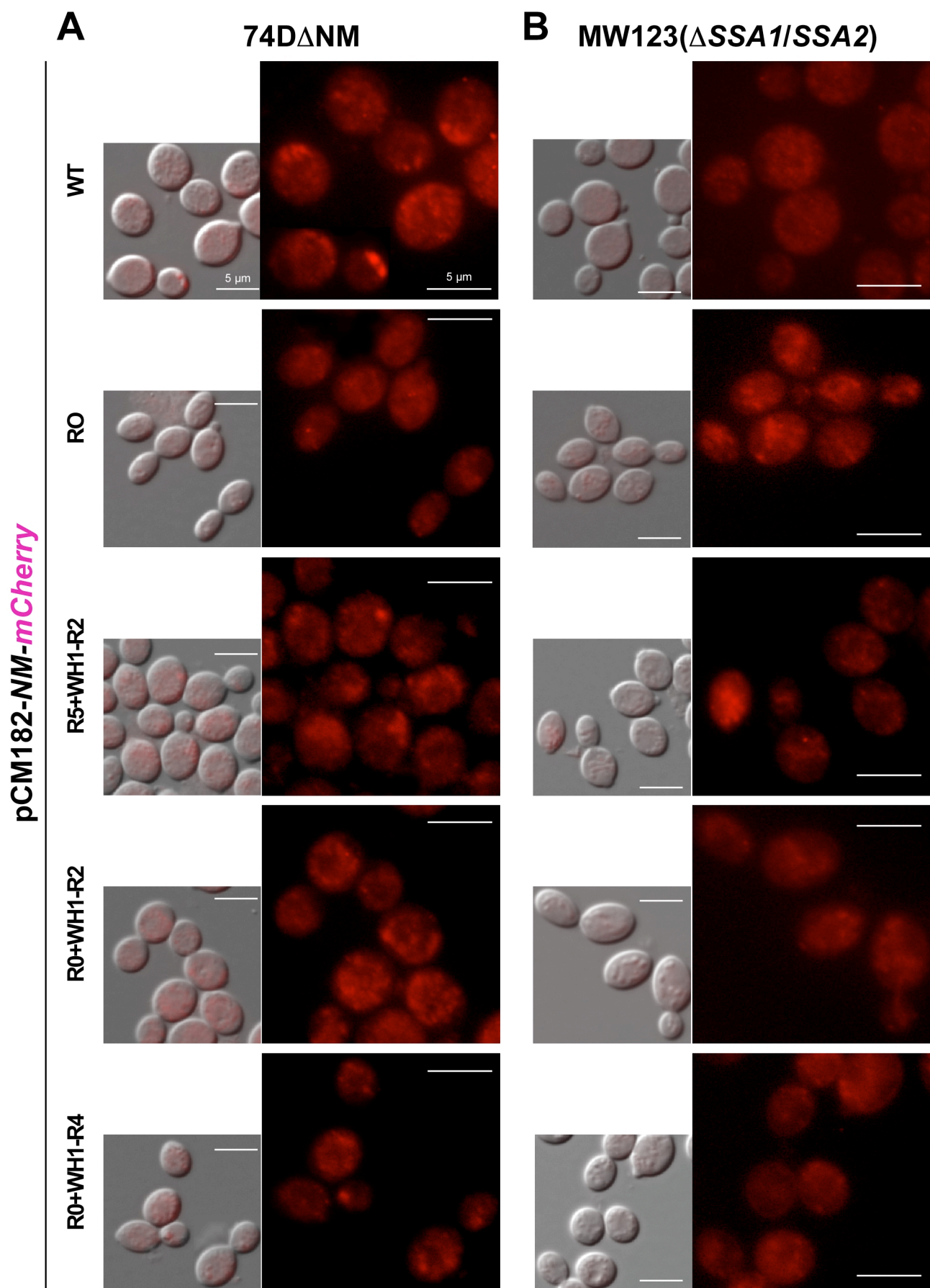
Después de la transformación e inducción de las quimeras NM con doxiciclina (un análogo de tetraciclina) y el crecimiento de las células durante 10 generaciones (la formación de fenotipo se da tras el transcurso de 2 días de crecimiento) (Song y col., 2005), se pudo observar al microscopio de fluorescencia la generación de pequeños núcleos fluorescentes en la estirpe NM (WT). La presencia de éstos sugiere que las proteínas NM(WT)-mCherry se encuentran en forma de agregados (Song y col., 2005), además éstos tienen localización citosólica, como cabe esperar de un fenotipo *[PSI<sup>+</sup>]* (Tuite y Cox, 2003; Kawai-Noma y col., 2010). Los agregados desaparecen para la versión carente de OPR, NM(R0)-mCherry, que origina una señal difusa en el citoplasma (**Figura 35.A**). Las proteínas R5+WH1-R2p, R0+WH1-R2p y R0+WH1-R4p parecen restablecer núcleos con intensidades de fluorescencia mayores, de tamaños heterogéneos, con una distribución concreta: parecen encontrarse adyacentes a la membrana y alrededor de las vacuolas. La sustitución de las repeticiones WH1R por las de Sup35p no alteraba la generación de agregados fluorescentes, indicando pues la aparición y presencia del prion *[PSI<sup>+</sup>]* (Zhou y col., 2001) (**Figura 35.A**).

##### 4.4.2. Efecto de las chaperonas Ssa1p y Ssa2p

La ausencia de fenotipo de la inhibición de Hsp104 en la propagación de las estructuras quiméricas llevó a plantear que otros mecanismos alternativos podrían estar involucrados en la transmisión de los agregados en *S. cerevisiae*. Por ello, se analizó el posible papel de las chaperonas Hsp70, de modo que se siguió la evolución de los agregados fluorescentes en la

estirpe MW123, que es deficiente para dos de las proteínas de la subfamilia de Hsp70: Ssa1p y Ssa2p. La delección de los 4 miembros de la subfamilia SSA (*SSA1-4*) resulta letal (Perret y Jones, 2008).

La doble delección  $\Delta$ ssa1 y  $\Delta$ ssa2 provoca un aumento de las partículas fluorescentes difusas, adquiriendo un fenotipo más parecido al que poseen las células [*psi*], similar al observado tras la expresión de la proteína ROp en la estirpe 74D $\Delta$ NM (**Figura 35.B**). La ausencia de Ssa1p o Ssa2p parece disminuir la estabilidad mitótica de los núcleos agregados en [*PSI*<sup>+</sup>] (Mathur y col., 2009) provocando, tanto en las estirpes WT como en las que portan las quimeras, la pérdida del estado priónico. De hecho, está descrito que una mutación negativa dominante en *SSA1* o *SSA2* genera curación de [*PSI*<sup>+</sup>] (Mathur y col., 2009).



**Figura 35.** La expresión de quimeras PrD-mCherry produce agregados citoplasmáticos. (A) Expresión por doxicilina del dominio formador del prion fusionado a la proteína fluorescente mCherry en la estirpe 74D- $\Delta$ NM de las diferentes versiones: WT, R0, R5+WH1-R2, R0+WH1-R2, R0+WH1-R4. En dicha expresión emergen inclusiones de mayor intensidad de fluorescencia y sucede en aquellas células predichas como  $[PSI^+]$ : WT, R5+WH1-R2, R0+WH1-R2, y R0+WH1-R4, mientras que la fluorescencia en R0 resulta difusa. (B) Expresión de las quimeras en la estirpe MW123, que es deficiente para las chaperonas Ssa1p y Ssa2p (Hsp70). La expresión en MW123 parece diluir los agregados visibles de (A) y la fluorescencia se transforma en una señal difusa a lo largo del citoplasma. Para (A) y (B) se representa en la columna de la izquierda la superposición de las imágenes tomadas en DIC y en el canal de fluorescencia roja intrínseca, de un campo representativo de cada cultivo. A la izquierda se muestra la imagen de fluorescencia magnificada. Las barras indican 5  $\mu$ m.

En resumen, estos resultados indican que repeticiones amiloidogénicas hidrofóbicas del prionoide bacteriano RepA-WH1 pueden reemplazar las repeticiones del dominio PrD, siempre que se incluyan al menos dos repeticiones. Las proteínas quiméricas son plenamente funcionales en la amiloidosis de levaduras actuando como elementos epigenéticos: pueden propagar la ganancia de función propia de  $[PSI^+]$  y mantener su competencia como prion. Esto sugiere que existen otras maneras alternativas a Hsp104 de modular la flexibilidad estructural y de ensamblaje necesaria para la propagación de los priones, en las que chaperonas de la familia Hsp70 pueden ser protagonistas.



---

## VI. DISCUSIÓN

---

## 1. EL AMILOIDE RepA-WH1(A31V) ES UN *PRIONOIDE* EN *E. coli*

### 1.1. Caracterización de la naturaleza *prionoide* de RepA-WH1(A31V)

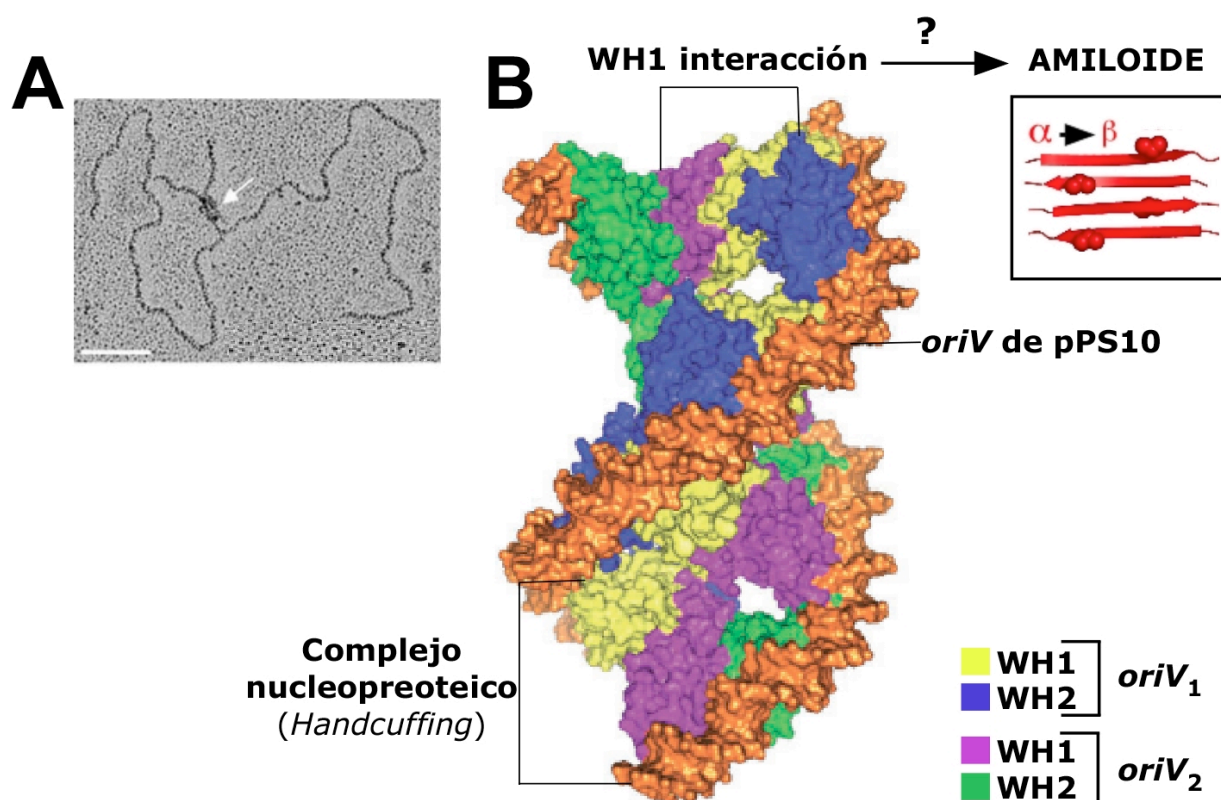
#### 1.1.1. Amiloidogenicidad

Los ensamblajes amiloides formados por RepA-WH1(A31V) *in vivo* pueden ser similares a los agregados observados *in vitro* (Giraldo, 2007; Gasset-Rosa y col., 2008b), pues la proteína se acumula en depósitos globulares capaces de unir el fluoróforo BTA-1, lo que indica que éstos tienen una estructura de lámina- $\beta$  cruzada. La colocalización de los núcleos rojos fluorescentes de WH1(A31V)-mCherry con la señal de BTA-1 así lo indica (**Figura 16.C**). La proteína WH1(A31V) se ensamblaría pues en el interior de la célula de una manera ordenada formando agregados, cuyos núcleos están compuestos por una estructura amiloide. Por otro lado, la naturaleza amiloide de los agregados de RepA-WH1 contribuye a que posean características bien determinadas: tamaños diferentes, distribución diversa en el citoplasma, alta proteotoxicidad y baja colocalización con IbpA (chaperona que media la transferencia de proteínas desplegadas a los cuerpos de inclusión) (Jurgen y col., 2010) (**Película S.2**). Estas características son claramente diferentes de las de los cuerpos de inclusión convencionales que han sido descritos en la literatura (Carrió y Villaverde, 2003) y observados en este trabajo tras la expresión de una versión de la proteína RepA-WH1( $\Delta$ N37) que, careciendo de las secuencias amiloidogénicas, agrega como cuerpos de inclusión (**Película S.2**) (Giraldo y col., 1998). La proteína bacteriana RepA-WH1 (A31V) es pues amiloidogénica *in vivo* (Fernández-Tresguerres y col., 2010).

La localización celular de los agregados es similar a la de plásmidos multicopia que carecen de sistema de partición cuando son marcados fluorescentemente (Pogliano y col. 2001, Anand y Khan 2010). Sin embargo, los focos de origen plasmídico normalmente tienen contornos circulares más definidos que las inclusiones de WH1(A31V). Además, resulta poco probable que los plásmidos utilizados para este estudio determinen el reclutamiento de los agregados de proteínas, y por lo tanto que actúen como transportadores físicos de las partículas agregadas: mientras que WH1(WT)-mCherry aparece dispersa en el citoplasma, WH1(A31V)-mCherry agrega formando inclusiones (**Figura 16**), a pesar de que las propiedades de unión al ADN son idénticas en ambas proteínas (baja afinidad y alta constante de disociación) (Giraldo y col., 1998; Giraldo, 2007).

Cabe destacar que la mutación puntual A31V que potencia la amiloidogénesis (Giraldo, 2007) se ha encontrado recurrentemente en estudios fisiológicos sobre la proteína RepA. Esta mutación genera efectos pleiotrópicos en la replicación de pPS10, pues amplía el rango de huésped del plásmido (Fernández-Tresguerres y col., 1995) y altera el control negativo de su replicación (Gasset-Rosa y col., 2008a). Este mecanismo de regulación de la replicación

(denominado *handcuffing*) consiste en la interacción en *trans* de monómeros de RepA unidos a su vez al origen de replicación de dos moléculas plasmídicas, de modo que el inicio de nuevas rondas de replicación está estéricamente impedido (**Figura 36**) (Gasset-Rosa y col., 2008a). El hecho de que el motivo amiloidogénico coincida con la región involucrada en formar el complejo de *handcuffing* sugiere que el ensamblaje de los monómeros a través de los WH1s podría ser del tipo amiloide (**Figura 36**). En tal caso, al igual que en otras proteínas amiloides funcionales en microorganismos, éste desempeñaría una función beneficiosa en la célula (Fowler y col., 2007). Además, dicha región amiloidogénica, que comprende la hélice- $\alpha$  2 y su lazo C-terminal, es la región de la proteína más flexible (con mayor factor B cristalográfico) de la estructura del dímero de RepA-WH1 (código PDB 1HKQ) (Giraldo y col., 2003), lo que sugiere que debe de ser clave en la dinámica conformacional de la proteína. La mutación A31V puede hacer que esa región de la proteína establezca interacciones distintas a las nativas, incrementando sus posibilidades de ensamblaje. No obstante, queda por establecer si estructuras amiloides participan o no en el proceso de *handcuffing*.



**Figura 36.** Posible naturaleza amiloide del complejo de *handcuffing*, implicado en regular la replicación del plásmido pPS10. (A) Micrografía electrónica del complejo. Se muestran dos moléculas plasmídicas linearizadas unidas por proteína RepA. (B) Modelo de la interacción, de las moléculas de RepA en el complejo nucleoproteico. Los monómeros de RepA se unen a dos orígenes de replicación localizados en *trans* (*oriV*, en naranja) y, a su vez, sus dominios WH1 interaccionan (amarillo-morado), bloqueando así nuevas rondas replicativas. La región amiloidogénica de WH1 participa en el ensamblaje intermonómero (Gasset-Rosa, 2008a). Este hecho sugiere que el núcleo de esta interacción puede tener carácter amiloide.

Tras el cambio conformacional de hélice- $\alpha$  a lámina- $\beta$  en el monómero de RepA, las hebras- $\beta$  se dispondrían de forma antiparalela (recuadro). La barra de magnificación representa 100 nm.

### 1.1.2. Trasmisibilidad molecular

Los agregados intracelulares que se observan como inclusiones discretas son capaces de actuar *ex vivo* como molde, para nuclear *in vitro* la amiloidosis de moléculas solubles de proteína nativa purificada. Aún en ausencia del ADN efector, los agregados intracelulares pueden generar fibras de aspecto idéntico a aquéllas formadas en presencia de *opsp* (Fernández-Tresguerres y col., 2010). Parece pues que una vez que el ADN ha promovido la transformación conformacional de la proteína WH1(A31V)-mCherry *in vivo*, ésta es preservada y la proteína actúa de molde para la amiloidogénesis *in vitro*. Ésta es una característica clave de los ensamblajes amiloides: su transmisibilidad molecular (Eichner y Radford, 2011; Aguzzi, 2009), que es consistente con la evidencia de que existe una transmisión de los primordios de RepA-WH1(A31V) de las células madres a las hijas (**Figura 19**), pues dichas partículas nuclearían la amiloidosis generando las inclusiones en la progenie. Este proceso es más eficiente que si dependiera exclusivamente de la generación estocástica de los núcleos agregados, a partir de la proteína soluble.

### 1.1.3. Transmisión vertical

Existen factores celulares como los ácidos nucleicos y chaperonas que promueven la amiloidosis de proteínas. Las chaperonas Hsp70 y Hsp104 generan las partículas transmisibles (propagones) a través de la fragmentación de los agregados intracelulares (Tuite y Serio, 2010). Los resultados presentados en esta Tesis indican que las chaperonas también están involucradas en la propagación de los núcleos amiloides de RepA-WH1(A31V) de las células madres a las hijas. Debido al pequeño tamaño de los propagones, no se pueden detectar por microscopía de fluorescencia convencional (Byrne y col., 2009; Sindi y Serio, 2009). En el caso de RepA-WH1, se observa antes de la septación (citoquinesis) un número discreto (por lo general uno) de partículas pequeñas emergentes de RepA(A31V)-mCherry que serán heredadas por la progenie. Éstas partículas, fáciles de transmitir, aparecen en los nuevos polos formados en las células hijas (**Figura 19**), y posteriormente crecen para formar inclusiones maduras. Eventualmente, la no transmisión de los mismos a las células hijas implica la curación de la amiloidosis en la progenie.

El conjunto de características descritas hasta ahora permiten definir a los agregados de RepA-WH1(A31V) como *prionoides* (Aguzzi, 2009): proteínas que agregan generando partículas amiloides capaces de transmitirse, molecular (*in vitro*) y verticalmente (*in vivo*, acoplada a la división celular), y que carecen de infectividad entre bacterias (transmisión horizontal). Conforme a tal definición, muchas proteínas amiloides causantes de enfermedades neurodegenerativas también son *prionoides* (péptidos A $\beta$ , huntingtina, tau y  $\alpha$ -sinucleína) (Tuite y Serio, 2010).

RepA-WH1(A31V) y la microcina E492 son, por el momento, los únicos amiloides puramente bacterianos clasificables como prionoides. El por qué no existen priones en bacterias, al contrario de lo que sucede con otros microorganismos como las levaduras, puede ser debido a que la presencia de secuencias amiloidogénicas en el proteoma de *E. coli* está reducida al mínimo (Rousseau y col., 2006). Probablemente, en condiciones prebióticas el ensamblaje amiloide pudo ser predominante, facilitando la autopropagación de las proteínas primigenias en un medio hostil (Greenwald y Riek, 2010). Sin embargo, en la actualidad se ha calculado que entre el 10-20 % de las proteínas de los proteomas tienen tendencia a agregar (Rousseau y col., 2006). En bacterias este porcentaje es menor, ya que la evolución ha favorecido la selección de secuencias no hidrofóbicas. De hecho las chaperonas Hsp70 poseen mayor afinidad por secuencias hidrofóbicas que están a menudo flanqueadas por residuos cargados que las protegen contra la agregación (Rousseau y col., 2006). Las chaperonas permitirían que las secuencias amiloidogénicas evolucionen, pues de otra manera hubieran sido purgadas del genoma (Villar-Piqué, 2011).

## 1.2. Estirpes conformacionales de RepA-WH1(A31V) en los microcanales de flujo

Se ha caracterizado la transmisión vertical del prionoide RepA-WH1(A31V) en *E. coli* durante decenas de generaciones utilizando un dispositivo de microfluídica acoplado a un microscopio de fluorescencia. Ésta es una técnica emergente que permite estudiar macromoléculas biológicas (Vyawahare y col., 2010) y células individuales (Yin y col., 2012) en términos cuantitativos. Las células de *E. coli* que colonizan el fondo de los microcanales están continuamente abastecidas por el medio de cultivo, bajo un régimen de flujo laminar, así que las bacterias pueden nutrirse fácilmente con los precursores metabólicos y crecer con tasas parecidas a las de cultivos líquidos en volúmenes grandes (Wang y col., 2010c), por lo que los estudios realizados en esta Tesis tienen relevancia fisiológica. Además de seguir el destino de la célula madre, esta técnica ha permitido trazar la dinámica intracelular de la proteína RepA-WH1 en la progenie de la célula madre. Estos resultados constituyen la primera aplicación de la microfluídica para estudiar la amiloidosis *in vivo*. El único precedente que existe hasta la fecha se empleó para estudiar la nucleación y el crecimiento de agregados amiloides de insulina *in vitro* (Knowles y col., 2011).

### 1.2.1. Polimorfismo estructural

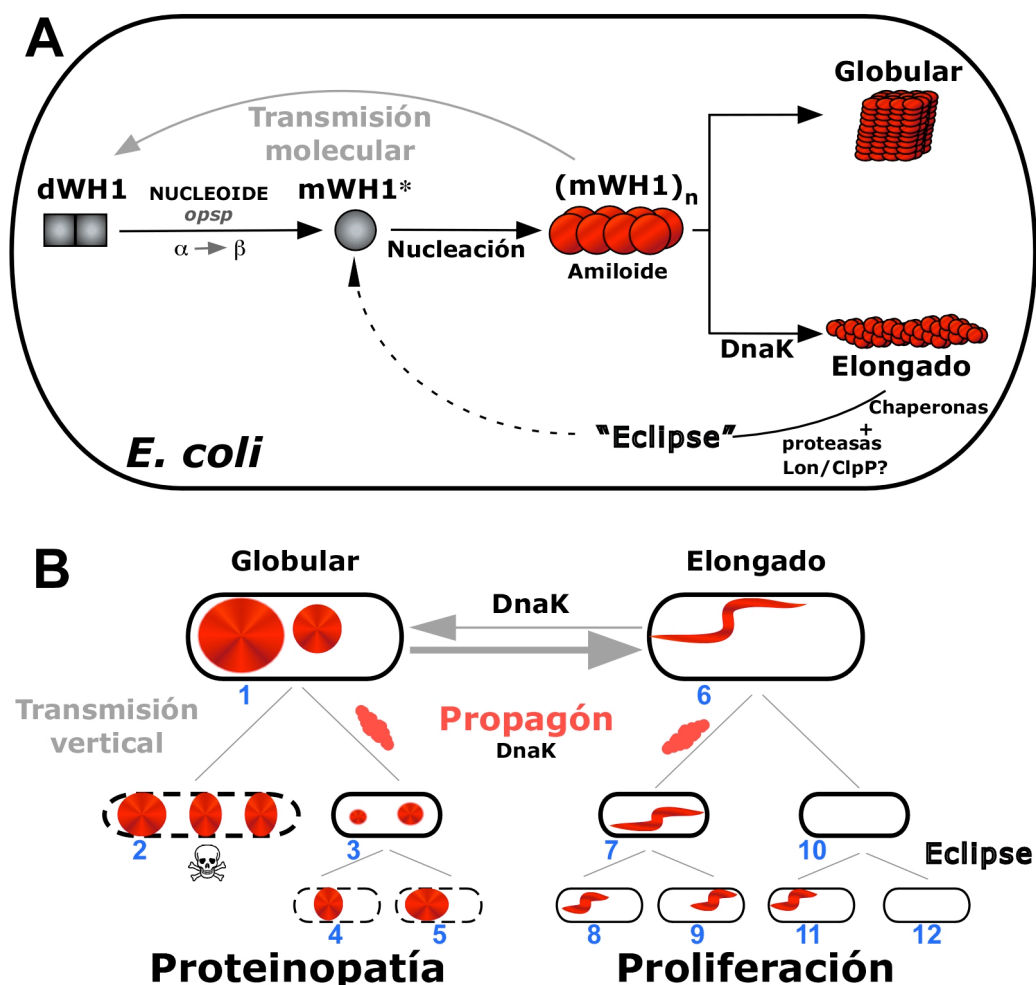
Comenzando con una población genéticamente homogénea de bacterias en un cultivo, una vez que se han cargado las células en los canales, éstas dan lugar a otras que portan agregados, o bien globulares o elongados (**Figura 30, 37**). Ambos tipos de células tienen el mismo nivel de expresión de la proteína amiloide. Esta segregación espacio-temporal es la esperada para

cualquier determinante epigenético basado en la agregación de proteínas (Tuite y Serio, 2010). Ya que estos dos tipos de agregados, en términos de morfología y toxicidad relativa, son fenotípicamente distintos y se heredan de un modo estable durante varias generaciones, se pueden considerar como diferentes estirpes del prionoide RepA-WH1(A31V); en el mismo sentido en el que este término se aplica a las estirpes de priones y prionoides en mamíferos (PrP,  $\alpha$ -sinucleína, péptido A $\beta$ ,  $\beta$ 2-microglobulina) y en hongos (Sup35p, Het) (Colby y Prusiner, 2011; Toyama y Weissman, 2011; Weissmann y col. 2011). Al igual que las estirpes de estos últimos, las variantes del prionoide (globulares y elongadas) se diferencian en su conformación y confieren distintos fenotipos en la proliferación celular (**Figura 37**), apoyando la hipótesis del prion. Esto es crucial en las enfermedades neurodegenerativas, ya que cada conformación lleva asociada una toxicidad diferente. En el prion de levaduras [*PSI*<sup>+</sup>] se han creado distintas conformaciones amiloides *in vitro* que resultan en distintas estirpes (fenotipos) *in vivo* (Tanaka y col., 2006; Toyama y col., 2007).

Tras la inducción de la proteína RepA-WH1(A31V), los primeros agregados que aparecen son los del tipo globular, que componen la forma más común de agregación. Lo mismo sucede en los priones [*PSI*<sup>+</sup>] y [*Het-s*], pues en las células hijas tras la división aparecen primero agregados globulares de pequeño tamaño (Mathur y col., 2010). La aparición posterior de los agregados elongados de RepA-WH1 es el resultado de la acción de los cofactores celulares como las chaperonas: cuando se sobreexpresa DnaK la mayoría de los agregados presentan morfología elongada mientras que, si se inhibe, son globulares (**Figura 30**). Asimismo, se observa que los grandes agregados globulares polares de las células fundadoras sufren, a lo largo del tiempo, continuas escisiones que generan agregados elongados.

La diferencia estructural entre los agregados globulares y los elongados conlleva un empaquetamiento y una estabilidad particulares, resultando en una morfología intracelular distinta. La disimilitud conformacional puede provenir de distintas condiciones ambientales para la célula, como diferencias de hidratación o estrés oxidativo o xenobiótico (Wiltzius y col., 2009). En cuanto al empaquetamiento diferencial, los agregados elongados tienen apariencia de menor compacidad (**Figura 22, 27**), lo que podría originar que las estructuras elongadas sean más inestables y resulten más vulnerables a la acción de las maquinarias macromoleculares de disgregación, como chaperonas (Hsp70 y Hsp104) y proteasas (en particular Lon y ClpP, que son las mayoritarias del citoplasma de *E. coli*) (**Figura 37**) (Toyama y col., 2007). Esto puede provocar los ciclos de aparición y desaparición de los agregados que se observan esporádicamente en un canal microfluídico dado. Tras la disgregación, el auto-ensamblaje por nueva nucleación genera otra vez partículas elongadas que son apreciables en las siguientes generaciones. Esto puede explicar el por qué los agregados elongados son menos tóxicos para el crecimiento y la proliferación, pues la

célula puede combatirlos por medio de la disgregación y proteólisis (**Figura 37**) (Winkler y col., 2010). Por otro lado, los agregados globulares poseen estructuras más estables y tienen disminuida su capacidad de replicativa mediada por las chaperonas (Toyama y col., 2007), suponiendo un reto para las maquinarias de control de calidad de las proteínas en la célula. De hecho, el prion  $[PSI^+]$  existe en conformaciones globular y elongada, que recuerdan a los agregados del prionoide RepA-WH1. La conformación elongada de  $[PSI^+]$  no provoca toxicidad y tiene menos capacidad de transmitir el estado priónico a la progenie (Tyedmers y col., 2010b).



**Figura 37.** Esquema de la dinámica de ensamblaje del prionoide RepA-WH1(A31V) en *E. coli*. (A) El dímero de WH1 es disociado por su unión al ADN del nucleóide que dirigen el cambio conformacional de hélice- $\alpha$  a lámina- $\beta$ . Esto genera un intermediario metaestable (mWH1\*) que puede nuclear el auto-ensamblaje y moldear el cambio conformacional en moléculas nativas (transmisibilidad molecular), resultando en un agregado (mWH1)<sub>n</sub>, que tiene naturaleza amiloide. Éste se presenta en forma de dos variantes o estirpes conformacionales: globular y elongada. La aparición de los agregados elongados implica la acción de la chaperona Hsp70. La maquinaria de disgregación celular (chaperonas y proteasas) provoca la disgregación del agregado (ciclos de eclipse), tras los cuáles los agregados pueden reaparecer por nueva nucleación. (B) Dinámica interpoblacional del prionoide. Las variantes confieren dos fenotipos distintos en la proliferación de *E. coli*: la variante globular (célula 1), es tóxica, induciendo filamentación (2) y/o reduciendo su tasa de división (3), hasta que detienen el crecimiento (4 y 5). Los agregados elongados (6), por el contrario, se propagan fácilmente y son menos tóxicos (7-9). Sin embargo, experimentan periódicamente fases de eclipse (3) en las que desaparecen, probablemente por acción de chaperonas y proteasas (10 y 12), aunque los amiloides pueden reaparecer en la progenie tras un evento de nucleación espontánea (11).

### 1.2.2. Interconversión entre estirpes

Con baja frecuencia, una célula madre que porta un tipo de agregado en un canal, puede espontáneamente empezar a generar el otro tipo, siendo más frecuente el cambio de elongado a globular que al revés (**Figura 37**). La dinámica de interconversión entre los dos tipos de estructuras en RepA-WH1 recuerda a la conversión entre estirpes del prión PrP y Sup35p (Liu y Lindquist, 1999; Tank y col., 2007; Weissmann y col., 2011). Cabe destacar que también se ha descrito la interconversión entre las especies globulares y elongadas en [*PSI*<sup>+</sup>] (sobretudo de la primera a la segunda) (Kawai-Noma y col., 2010; Tyedmers y col., 2010b). Esto supone que el prionoide RepA-WH1(A31V) es capaz de manifestar, además de estirpes conformacionales, interconversión entre ellas.

El estudio mediante técnicas de microfluídica del prionoide RepA-WH1 ha provisto para células individuales y durante divisiones que abarcan muchas generaciones, una evidencia visual de la estabilidad e interconversión entre dos estirpes de amiloides, que componen distintas cuasiespecies (Weissmann y col., 2011) a partir de una misma proteína con características dispares: morfológicas (agregados globulares frente a elongados), de número por célula (múltiples frente a único) y citotoxicidad (aguda frente a leve).

### 1.3. Toxicidad del prionoide

Si comparamos la división de las células que expresan las proteínas RepA-WH1(A31V) o WT con respecto a las células libres de inclusiones (**Película S.1**), se observa que las primeras expanden su tiempo de generación hasta cinco veces hasta que, tras pocos ciclos de división, detienen su crecimiento. De hecho, la población de células que no poseen agregados debido a su mayor proliferación, invaden rápidamente el cultivo (**Película S.1**). La expansión del tiempo de generación y la quiescencia de las células que heredan el polo viejo son síntomas de envejecimiento (Stewart y col., 2005; Lindner y col., 2008; Winkler y col., 2010). Las grandes inclusiones de WH1(A31V) producen quiescencia, pero hasta el extremo de que producen filamentación celular y detención del crecimiento, manifestación de la alta toxicidad de los agregados globulares. Hasta la fecha, la toxicidad de las inclusiones de WH1(A31V)-mCherry, en términos de tasa de división celular, es mayor que la descrita en comparación con las inclusiones intracelulares de los cuerpos de inclusión típicos en *E.coli*, que son menos citotóxicos (Stewart y col., 2005; Lindner y col., 2008; Winkler y col., 2010).

La localización polar de las inclusiones grandes globulares de RepA-WH1(A31V) parece estar determinada por la gran fracción de volumen excluida por el nucleoide (Winkler y col., 2010) y puede ser indicativa de su toxicidad implícita. Su reparto asimétrico puede ser consecuencia de una estrategia celular para segregar el daño ejercido por éstos (**Figura 5**) (Lindner y col., 2008;



Winkler y col., 2010). En cambio, las inclusiones pequeñas globulares se distribuyen aleatoriamente en el citoplasma celular, al igual que los agregados elongados. Esto puede reflejar la mayor difundibilidad de las partículas pequeñas en el citoplasma. Además, ambos tipos de agregados colocalizan con la chaperona DnaK (**Figura 27**), por lo que la maquinaria molecular que asiste al plegamiento actuaría aliviando el impacto dañino de la agregación (**Figura 37**).

La toxicidad de las inclusiones de RepA-WH1(A31V) puede deberse a la exposición de residuos hidrofóbicos, que generalmente los cuerpos de inclusión tienden a reducir. En particular, las especies más tóxicas son las partículas prefibrilares ya que poseen mayor número de residuos de esa naturaleza expuestos (Carrió y Villaverde, 2005). La interacción de precursores oligoméricos con membranas parece ser uno de los mecanismos responsables de las causas de la toxicidad de los amiloides, bien sea a través de la formación de poros, mediante la extracción de lípidos (un efecto similar al de los detergentes) o mediante una disminución del espesor de la membrana (Butterfield y Lashuel, 2010). Por otro lado, la toxicidad también puede estar asociada a un estrés oxidativo: en los compartimentos IPOD de agregación de amiloides en levaduras, se encuentran las proteínas dañadas por estrés oxidativo. Además, al igual que en bacterias, estos compartimentos también son heredados asimétricamente (Tyedmers y col., 2010a).

Hasta la fecha no se conoce ningún prionoide en bacterias que se perpetúe en dos estados (soluble y agregado) en el citoplasma. El único estudio realizado de la propagación de priones intracelulares en bacterias ha sido realizado con proteínas que no son de origen bacteriano: el prion de la proteína Sup35p es capaz de reproducir su propagación en bacterias aunque bajo la presencia de cofactores [*PIN<sup>+</sup>*] (Garrity y col., 2010). De igual modo, Sup35p también puede propagarse en células de mamífero (Krammer y col., 2009). Los agregados de la proteína RepA-WH1 constituyen pues el primer amiloide intracelular en procariotas que se transmite a la progenie y que genera una proteinopatía. Esto abre una vía al estudio de la amiloidosis en un organismo con unos 4000 genes y, por lo tanto, con un interactoma reducido.

## 2. COFACTORES DE LA AMILOIDOSIS EN *E. coli*

### 2.1. Inducción de la amiloidosis de RepA-WH1(A31V) por el ADN *in vivo*

La proteína RepA-WH1(A31V) posee la capacidad de formar ensamblajes amiloides *in vitro* que dan lugar a fibras (Giraldo, 2007; Gasset-Rosa y col., 2008b). Dicho ensamblaje se estimula a través de la unión transitoria de pequeños ligandos de ADN con secuencia específica (*opsp*), y que actúan como potenciadores de la amiloidosis de RepA-WH1, al seleccionar un subconjunto de conformaciones de la proteína, que fluctúan en equilibrio, con tendencia a agregar, dirigiendo así el proceso hacia el ensamblaje amiloide (Boehr y col., 2009). En este caso, el ADN actúa como efector alostérico (Díaz-López y col., 2003; Giraldo, 2007). Se ha conseguido potenciar la

amiloidosis de RepA-WH1 en células de *E. coli* mediante la introducción de repeticiones en tándem de la secuencia *opsp* en el vector de expresión. Éstas incrementan la deposición de moléculas de RepA-WH1(A31V) en las inclusiones intracelulares (**Figura 16**). Hay que remarcar que, permitiendo una sola variación en la secuencia *opsp*, el genoma de *E. coli* porta 48 copias dispersas de la misma, que parecen capaces de promover la agregación de WH1(A31V) en ausencia de las repeticiones adicionales en el plásmido, aunque lo hacen con una frecuencia menor (**Figura 16**). La inducción por parte de la secuencia de ADN parece ajustarse a cantidades sub-estequiométricas con respecto a RepA-WH1, lo que unido a la interacción transitoria entre ambas macromoléculas es indicativo de un proceso catalítico. Alternativamente, se puede concluir que, en cierto sentido, el ADN actúa como una chaperona molecular ya que asiste al plegamiento y al ensamblaje de WH1 en las estructuras amiloides (True, 2006; Giraldo, 2007).

El sistema mínimo RepA-WH1(A31V) ha permitido estudiar el efecto de la inducción de los ácidos nucleicos en la amiloidogénesis, tanto *in vitro* (Giraldo, 2007; Gasset-Rosa y col., 2008b) como *in vivo* (Fernández-Tresguerres y col., 2010). El efecto de los ácidos nucleicos en la amiloidogénesis ha sido también estudiado en proteínas involucradas en enfermedades neurodegenerativas amiloides, como la  $\alpha$ -sinucleína (Hegde y col., 2010) y el prion PrP (Cordeiro y col., 2001; Silva y col., 2008). La proteína PrP y RepA-WH1(A31V), aunque no son estructuralmente homólogas, experimentan transiciones de hélice- $\alpha$  a hebra- $\beta$  análogas tras unirse a los ácidos nucleicos, que dan como resultado la agregación amiloide ordenada de dichas proteínas (Silva y col., 2010). Además de los ácidos nucleicos, también se conocen otros cofactores fisiológicos que son relevantes para la amiloidosis de PrP, como los glicosaminoglicanos o los fosfolípidos (Deleault y col., 2007; Deleault y col., 2010; Wang y col., 2010).

Aunque la mayoría de las amiloidosis descritas hasta la fecha suceden en el citoplasma, ha sido recientemente descrito el primer prion de levaduras que se propaga en el núcleo: el factor de transcripción Sfp1/[ISP<sup>+</sup>] (Ragoza y col., 2010). El papel del ADN en la amiloidosis de RepA-WH1 (A31V) promovida por el ADN adquiere importancia adicional ya que los depósitos amiloides que se acumulan en el núcleo se asocian a algunas enfermedades neurodegenerativas, como las causadas por proteínas que portan repeticiones de poliglutaminas en la enfermedad de Huntington (De Rooij y col., 1996), diversas ataxias espinocerebelares (Bauer y Nukina, 2009) y, ocasionalmente, en las encefalopatías espongiiformes transmisibles (Mange y col., 2004).

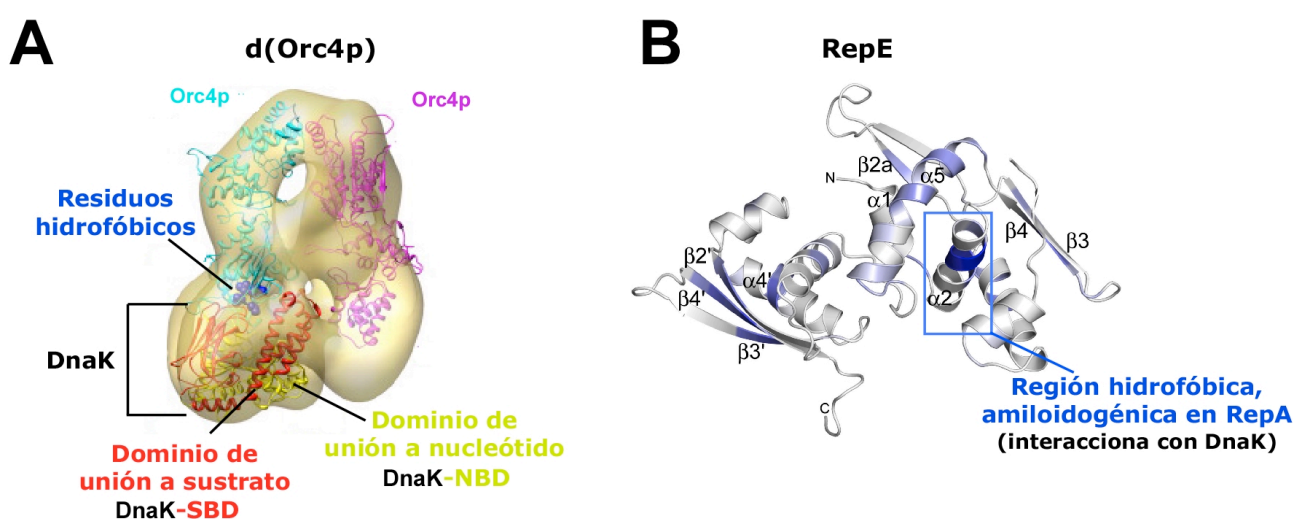
## 2.2. Chaperonas DnaK y ClpB: su efecto sobre la transmisión de primordios amiloides

Una de las cuestiones más relevantes para la ciencia de las proteínas es conocer cuál es la naturaleza de los cofactores que promueven *in vivo* los cambios conformacionales amiloides (Giraldo, 2007). Este enigma ha existido desde los principios del estudio de la biología de los priones, pues Prusiner propuso que una proteína desconocida (“proteína-X”) debía de estar involucrada como cofactor en facilitar la adquisición del estado amiloide por PrP (Prusiner, 1998). En los priones de levaduras, las chaperonas moleculares parecen ser dichos cofactores (Mayer, 2010).

En la propagación de levaduras, Hsp70 y Hsp104 actúan coordinadamente (Shorter y Lindquist, 2008; Haslberger y col., 2010). En el prionoide RepA-WH1 existe también una sinergia entre ambas chaperonas, ya que su transmisión está más comprometida en bacterias cuyo fondo genético es *dnaK756 ΔclpB* (**Figura 24**), que en las estirpes que portan una u otra mutación (*dnaK756* o *ΔclpB*). DnaK claramente tiene un papel central en promover la propagación del prionoide, pues tanto su inhibición como su sobreexpresión provocan alteraciones en ella. Cuando se sobreexpresa DnaK, aumentan los agregados elongados hasta ser la población mayoritaria; además, los agregados elongados colocalizan con DnaK. Por el contrario, DnaK no es competente por sí sola para reactivar los cuerpos de inclusión y requiere de ClpB para hacerlo eficientemente (Lewandowska y col., 2007; Acebron y col., 2009). Ésta despliega las proteínas de los cuerpos de inclusión cuando se sobreexpresa, y conlleva la solubilización y/o posterior degradación proteolítica de las mismas (Doyle y Wickner, 2009). Pero ClpB parece tener sobre el prionoide una función marginal, pues la propagación de los agregados WH1(A31V) es relativamente independiente de ClpB, al no tener su delección o su sobreexpresión mayor efecto. Así se establece otra diferencia entre el prionoide y los cuerpos de inclusión convencionales, a parte de la distribución intracelular heterogénea y mayor toxicidad de aquél. Cabe destacar que DnaK se suele localizar distribuida alrededor de la superficie de los cuerpos de inclusión (Carrió y Villaverde, 2005) y no se halla agrupada en sectores discretos en el interior de los agregados de proteína, tal y como se ha encontrado en este trabajo en el caso del prionoide RepA-WH1(A31V).

Se ha descrito que Hsp70 interacciona con los dímeros de RepA (Giraldo y Díaz-Orejas, 2001) y, de hecho, los dímeros de otras proteínas de la familia Rep también son remodelados por DnaK (Zzaman y col., 2004; Nakamura y col., 2007). DnaK, a través de la unión al dominio WH1, convierte los dímeros de RepA en monómeros activos que son los iniciadores de la replicación plasmídica (Wickner y col., 1992; DasGupta y col., 1993; Kim y col., 2002). Los detalles estructurales de un complejo entre la chaperona Hsp70 y el iniciador de replicación de levaduras Orc4p muestran que su interacción sucede a través de un motivo hidrofóbico en Orc4p, de modo

que la chaperona Hsp70 se une al dímero de Orc4p y, a través de la actividad ATPásica de su dominio N-terminal, disocia el dímero (**Figura 38.A**) (Moreno-del Álamo y col., 2010). Cabe destacar que el iniciador Orc4p posee similitud estructural con la proteína RepA (Giraldo y Díaz-Orejas, 2001). De hecho, la interacción de DnaK con la proteína RepE, homóloga a RepA, se realiza a través del dominio WH1 implicando la hélice- $\alpha 2$  (Nakamura y col., 2007), donde se localiza la región amiloidogénica en RepA (**Figura 38.B**). Tiene sentido que la misma chaperona permita el desplegamiento parcial de los agregados amiloides de RepA-WH1 y genere los oligómeros discretos. Además, DnaK es capaz de impedir la formación de fibras de la proteína WH1(A31V) *in vitro*, permaneciendo unida a oligómeros de la misma (comunicación oral María Moreno, miembro del laboratorio).



**Figura 38.** Detalle estructural de la interacción de la chaperona Hsp70 con los iniciadores de la replicación Orc4p y RepE. (A) Estructura del complejo de un dímero inactivo de Orc4p y DnaK. Orc4p pertenece al complejo iniciador de la replicación que reconoce el origen de replicación en *S. cerevisiae*. La estructura fue determinada a baja resolución mediante microscopía electrónica. DnaK, mediante su dominio C-terminal, reconoce específicamente a los residuos hidrofóbicos de Orc4p y, a través de su actividad ATPasa del dominio N-terminal, disocia el dímero. La proteína Orc4p posee homología estructural con RepA. (B) Predicción de las regiones de RepE (homólogo de RepA) que interaccionan con Hsp70, dichas regiones están marcadas en azul oscuro. Parte del dominio WH1 participa en la interacción, en concreto su hélice- $\alpha 2$ , que se corresponde con la región amiloidogénica de RepA. El panel A está tomado de Moreno-del Álamo y col. (2010) y el panel B del trabajo de Nakamura y col. (2010).

Considerando la ausencia aparente de algún gen *HSP104* en eucariotas superiores, los resultados de esta Tesis apuntan a que las chaperonas Hsp70s son las principales responsables del control de la propagación de priones y de prionoides en las células humanas. Convencionalmente, se han utilizado los priones de levaduras como sistemas modelo, sin embargo, presentan dos limitaciones principales: i) sus secuencias amiloidogénicas son ricas en Gln y Asn, como sucede en la proteínas involucradas en la enfermedad de Huntington y en ataxias relacionadas, pero no en las demás amiloidosis, cuyas proteínas portan segmentos hidrofóbicos; ii) no causan una proteinopatía clara en las levaduras y, aunque el prion [*PSI*<sup>+</sup>] ha sido propagado

con éxito en *Escherichia coli* (Garrity y col., 2010), tampoco aquí se comporta propiamente como un agente patógeno. Asimismo, la existencia de genes parálogos de *HSP70* en eucariotas (Albanèse y col., 2006) supone un reto adicional en la comprensión de la contribución de éstos en la amiloidogénesis priónica. *E. coli* teniendo una sola copia de un gen *HSP70* (DnaK), nos permite descubrir cómo esta chaperona posibilita la transmisión del prionoide RepA-WH1 al generar, a partir de los agregados globulares amiloides, pequeñas partículas oligoméricas y agregados elongados que se propagan fácilmente a las células hijas durante la división celular. El prionoide RepA-WH1(A31V) es entonces un sistema mínimo sintético óptimo para el estudio de la amiloidosis de proteínas.

### **3. RepA-WH1(A31V) DETERMINA LA AMILOIDOSIS EN UN PRION HETERÓLOGO *IN VIVO*: QUIMERAS CON [PSI<sup>+</sup>] EN *S. cerevisiae***

El prion [PSI<sup>+</sup>] de *S. cerevisiae* ha sido utilizado como herramienta para determinar el potencial prionogénico de secuencias heterólogas de proteínas objeto de estudio (Tuite y Cox, 2003). Para llevar a cabo este tipo de análisis, se diseñan proteínas quiméricas con Sup35p, de modo que se reemplaza su dominio formador de prión (PrD) por la secuencia que posee el potencial amiloidogénico a estudiar. Este tipo de aproximación se ha realizado con PrP (Tank y col., 2007), con el péptido Aβ amiloide (von der Haar y col., 2007) y con CPEB, proteína involucrada en la memoria a largo plazo (Heinrich y Lindquist, 2011).

Para llevar a cabo esos estudios se realiza en *S. cerevisiae* una serie de ensayos canónicos que abarcan diversos aspectos del carácter priónico. La naturaleza prionogénica de las secuencias heterólogas, conforme se desprende de los ensayos en levaduras, incluye determinadas características: capacidad de adoptar distintos estados de la proteína heredables (monitorizado mediante ensayos de supresión de alelos de los genes *ade1* o *ade2*); generación de agregados altamente estables (visualizados por técnicas electroforéticas en geles semi-desnaturalizantes); formación de núcleos en el citosol (microscopía de fluorescencia); formación de amiloides *in vitro* a partir de la proteína soluble (microscopía electrónica); y dependencia de la chaperona Hsp104 para la propagación de los priones (inferida del tratamiento con guanidina) (Garrity y col., 2010). Si las secuencias heterólogas que reemplazan a la región PrD reproducen el comportamiento priónico de [PSI<sup>+</sup>], se puede considerar que las proteínas correspondientes poseen naturaleza priónica.

En los resultados presentados en esta Tesis, las proteínas Sup35\_WH1-R forman agregados priónicos, que se ajustan a los ensayos estándar de priones en levaduras: son complejos de alto peso molecular resistentes a detergentes y suprimen los codones de terminación, permitiendo la síntesis de adenina en cantidades suficientes. Las quimeras

Sup35\_WH1(A31V) en levaduras pueden por lo tanto producir conversión al estado amiloide, que conlleva una ganancia de función similar a Sup35p; en cambio, su propagación no depende de Hsp104. WH1-R impondría pues su dependencia de Hsp70 al prion Sup35p/[*PSI*<sup>+</sup>], por lo que RepA-WH1 en *S. cerevisiae* se comporta como un módulo ortogonal, relativamente independiente y sin citotoxicidad aparente.

### 3.1. Repeticiones oligopeptídicas (OPR) mixtas (Q/N-hidrofóbicas) en la propagación de priones

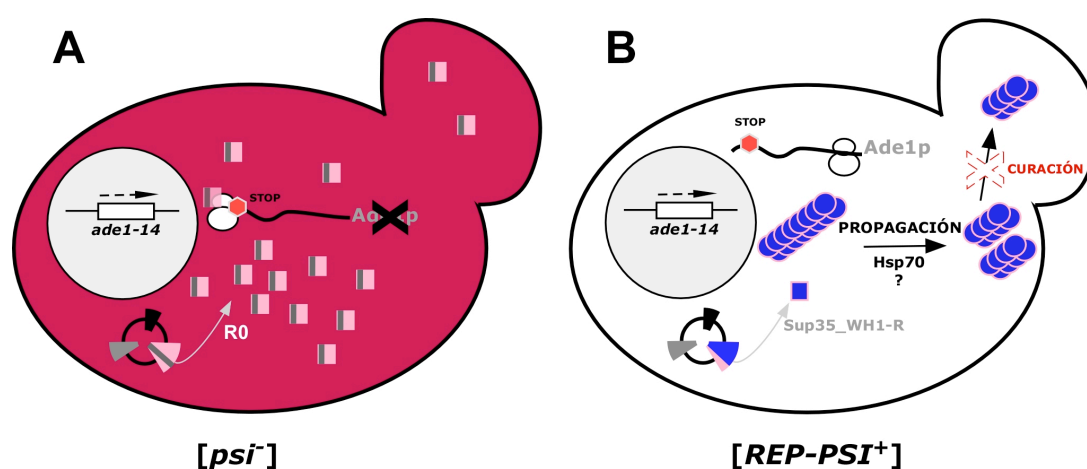
Sup35p tiene en su dominio PrD una composición aminoacídica inusual con baja complejidad de secuencia, pues posee abundancia en residuos polares de glutamina y asparagina. En el modelo más aceptado de la estructura de las fibras amiloides de Sup35p, los residuos idénticos de la región amiloidogénica se auto-ensamblan, disponiendo las hebras-β paralelamente (Shewmaker y col., 2006). Por su parte, el modelo propuesto del dominio amiloidogénico de WH1(A31V) es de hebras-β dispuestas en orientación antiparalela (**Figura 9.D**) (Giraldo, 2007). El hecho de que la proteína quimérica con dos repeticiones R5+WH1-R2 reproduzca el fenotipo [*PSI*<sup>+</sup>], sugiere que una lámina-β cruzada mixta es capaz de ensamblarse incluyendo el péptido WH1-R2 y las cinco repeticiones de Sup35p. En las estructuras paralelas el apareamiento de residuos cargados es desfavorable, por lo que el segmento WH1-R2 debe acoplarse a la lámina paralela de Sup35 formando un apéndice en estructura antiparalela. Esto explicaría el que la quimera con una sola repetición, R5+WH1-R1, no sea funcional y se requieran dos copias del segmento peptídico para recuperar esa funcionalidad.

Las repeticiones WH1-R que reemplazan a las de Sup35 fueron diseñadas para construir el núcleo de una estructura amiloide-β, de modo que se dispusieran altamente ordenadas en hebras-β antiparalelas (**Figura 31**). En las estructuras antiparalelas, la mayoría de los contactos a lo largo de la fibra se establecen entre residuos no idénticos, presumiblemente complementarios (con carga positiva-negativa, como sucede con RepA-WH1 entre R<sub>25</sub> y D<sub>35</sub>, o pequeños con grandes) o similares (hidrofóbico con hidrofóbico y polar con polar) (Ross y col., 2005a). Esta estructura supone un incremento en el requerimiento de especificidad de secuencia (Shewmaker y col., 2011). Las repeticiones de la secuencia amiloidogénica de RepA-WH1(A31V) disponiéndose en hebras antiparalelas, pueden por lo tanto sustituir a la región PrD de Sup35p y, al igual que ésta última, el prion resultante [*REP-PSI*<sup>+</sup>] constituye un elemento epigenético de herencia no mendeliana.

#### 3.1.1. Pérdida espontánea del prion quimérico Sup35p\_WH1-R1 y R2

La pérdida del prion (curación) de Sup35p provoca la transformación de fenotipo de [*PSI*<sup>+</sup>]→[*psi*<sup>-</sup>] y supone un cambio en la coloración de las colonias (de blancas a rojas) (**Figura 39**); la

frecuencia con la que ocurre es de  $10^{-6}$ , de la que se infiere el número de generaciones en las que se mantiene estable un elemento epigenético (Lund y Cox, 1981; Liu y Lindquist, 1999; Tuite y Cox, 2003). Las colonias R0+WH1-R1 y R0+WH1-R2 presenta tras su crecimiento sectores con una tonalidad más oscura, lo que sugiere que existen variantes o estirpes priónicas que implican diferencias estructurales en sus núcleos amiloides (Cox y col., 2007). Las colonias que adquieren la tonalidad más oscura son variantes priónicas débiles; entre éstas y las estirpes fuertes existen diferencias en la generación del número de propagones y/o en la tasa de agregación (Cox y col., 2007). Aunque manifiesten fenotipo de ganancia de función y exista lectura continua del codón *stop*, la inestabilidad de las quimeras R0+WH1-R1 y R0+WH1-R2 puede deberse a que no establezcan un núcleo de lámina- $\beta$  estable que genere una estructura priónica consistente, resultando así en estirpes priónicas débiles. Dicha inestabilidad provoca que, a lo largo de las generaciones y tras diversos pases, las estirpes débiles sean curadas y pasen a ser rojas (**Figura 34**), con una tasa de conversión extraordinariamente elevada (30%). Además, las repeticiones R1 y R2 de la proteína silvestre Sup35p son los elementos primarios determinantes de la inducción y de la formación del prión (Osherovich y col., 2004), al componer el núcleo de la fibra amiloide (Toombs y col., 2011) y ser imprescindibles para el mantenimiento del fenotipo [*PSI*<sup>+</sup>] (Liu y col., 1999).



**Figura 39.** Representación del ensayo de codones *stop* por supresión de Sup35\_R0 y de Sup35\_WH1-R en *S. cerevisiae*. (A) La proteína Sup35\_R0 es el control negativo de los ensayos realizados, pues R0p se encuentra en estado soluble, de modo que es funcional y reconoce el codón *stop* del ARN mensajero *ADE1-14*, deteniendo la traducción del mismo. Esto conlleva una coloración roja de las colonias. (B) Se muestra la supresión llevada a cabo por las proteínas quiméricas Sup35\_WH1-R. La proteína nativa (representada por cuadrados) sufre el cambio conformacional amiloide, de modo que la proteína resultante (representada como círculos) promueve la agregación y genera el fenotipo priónico [*REP-PSI*<sup>+</sup>]. El agregado retiene a la proteína en un estado no funcional, que permite la lectura continua del codón *stop* y, por consiguiente, la coloración blanca de las colonias. La propagación de los priones [*REP-PSI*<sup>+</sup>] es llevada a cabo por un mecanismo alternativo diferente al de Hsp104, en el que puede estar involucrada la chaperona Hsp70. Tras la partición de los agregados, los propagones resultantes se distribuyen a la yema naciente, transmitiendo el fenotipo [*REP-PSI*<sup>+</sup>]. La no propagación de los mismos supondría la pérdida del fenotipo priónico (curación).

### 3.1.2. Estabilidad de las quimeras Sup35p\_WH1-R3, R4 y R5

La sustitución de OPR por 3 repeticiones de WH1-R parece afianzar el núcleo amiloide de la proteína quimérica Sup35p\_WH1-Rp, por lo que el prion producido sería más estable, dando lugar a colonias blancas uniformes. La estabilidad de un prion está relacionada directamente con la capacidad de generar propagones, cuyo mayor número implica mayor estabilidad mitótica, por lo que la tasa de curación será menor (Cox y col., 2007). La elevada estabilidad de  $[PSI^+]$  WT y de las quimeras que poseen 3, 4 y 5 repeticiones WH1-R conlleva que la tasa de curación espontánea observada sea muy baja (ronda el 1%, **Figura 34**). La baja tasa de curación puede ser debida a que la distribución de los propagones, que acostumbra a ser proporcional al volumen relativo de las células madre e hija en la citoquinesis (Cox y col., 2007), sufra alteraciones generando una mayor inestabilidad y a que no exista una partición equitativa. Cinco generaciones sucesivas de segregaciones defectivas pueden generar que alrededor de un 3% de las células posean un número limitante de propagones (Cox y col., 2007).

En su conjunto esa metaestabilidad compone una de las características que diferencian al elemento epigenético priónico de los elementos genéticos clásicos; es decir, que los estados  $[PSI^+]$  y  $[psi^-]$  no son absolutos, las estirpes  $[PSI^+]$  se pueden convertir a  $[psi^-]$  y viceversa, lo que sucede con frecuencias bajas, pero medibles.

## 3.2. Cofactores de la amiloidosis en *S. cerevisiae*: chaperonas Hsp70 y Hsp104

### 3.2.1. Curación de las estirpes $[REP-PSI^+]$ por guanidina: papel de la chaperona Hsp104

El diseño de quimeras funcionales entre RepA-WH1 y el prion de *S. cerevisiae* Sup35p/ $[PSI^+]$  ha posibilitado caracterizar los requerimientos para la propagación del prionoide sintético en levaduras. El proceso de curación del prion puede ocurrir espontáneamente, por un reparto defectuoso de los propagones (apartado **Discusión 3.1.1**), o ser causada por factores externos. La curación impuesta por guanidina (que inhibe la actividad ATPásica de Hsp104) (Ferreira y col. 2001; Jun y Maison, 2001), impide el fraccionamiento de los agregados llevado a cabo por la disgregasa Hsp104. La guanidina produce curación en las estirpes Sup35p(WT) y R5+WH1-R2 al final del periodo estacionario del crecimiento, pues la partición se vuelve ineficiente y las células hijas en la división heredan con baja frecuencia los agregados  $[PSI^+]$ , por lo que los priones permanecen en el 90% de las células madres (Ness y col., 2002; Tanaka y col., 2006).

El fraccionamiento de los agregados y al mantenimiento del número de propagones depende de la interacción de Hsp104 con la región de las repeticiones oligopeptídicas (OPR) en Sup35p (Osherovich y col., 2004; Cox y col., 2007), aunque también otras regiones localizadas fuera del dominio PrD pueden influenciar la interacción con Hsp104 (Liu y col., 2002). Las



repeticiones bacterianas RepA-WH1(A31V), al ser hidrofóbicas, pueden no ser reconocidas por Hsp104, ya que la inhibición de su actividad no provoca alteración en la propagación de los priones quiméricos (las colonias R0+WH1-R1,2,3,4,5 se mantienen blancas) (**Figura 34**). Puede que una estructura de lámina- $\beta$  paralela sea el requisito imprescindible para el reconocimiento por parte de la chaperona Hsp104; esto apoya el hecho de que el cambio a estructura antiparalela llevada a cabo en las repeticiones WH1-R impida tal reconocimiento.

Las quimeras en las que se sustituyen las OPR de Sup35 por la secuencia hidrofóbica central del péptido A $\beta$ 42, también son independientes de Hsp104 (von der Haar y col., 2007). Es probable que la chaperona no pueda reconocer el dominio formador del prion en la proteína híbrida, ya que la hebra del péptido A $\beta$  se dispone de forma antiparalela (en la variante de Iowa y en los pequeños péptidos estudiados por Eisenberg; Sawaya y col., 2007). En cambio la sustitución de las repeticiones de Sup35 por las propias de PrP, que aisladamente forman una lámina- $\beta$  paralela (Sawaya y col., 2007), generan priones que son curados cuando se inhibe la acción de la chaperona Hsp104 (Tank y col., 2007). También el prion [*Het-s*], aunque tiene una composición que no es de G/N, sus hebras- $\beta$  se disponen paralelamente (Greenwald y Riek, 2010) y necesita a Hsp104 para propagarse (Taneja y col., 2007). Estos resultados apoyan las conclusiones obtenidas de los ensayos con el prionoide completo WH1(A31V) en *E. coli*, pues tanto éste como las quimeras no dependen de la chaperona ClpB (Hsp104) para su propagación.

### 3.3.2. Posible función de Ssa1p y Ssa2p en la propagación de las quimeras en *S. cerevisiae*

La búsqueda de un mecanismo alternativo involucrado en la partición de los priones [*REP-PSI<sup>+</sup>*], distinto al dependiente de Hsp104, conllevó al análisis por microscopía de fluorescencia del efecto de la doble delección  $\Delta ssa1$  y  $\Delta ssa2$  (*HSP70*) en la propagación. Estas chaperonas se encuentran asociadas a los agregados de Sup35p (Mathur y col., 2009) y parecen ser componentes principales de los polímeros de Sup35p *ex vivo*, pues aparece una molécula de Ssa1/2p por cada dos de Sup35p (Sweeny y Shorter, 2008). Además se ha visto que la doble delección  $\Delta ssa1$  y  $\Delta ssa2$  cura el prion [*GAR<sup>+</sup>*], que es independiente de la acción de Hsp104 (Brown y Lindquist, 2009). Como resultados preliminares observamos que la ausencia de las chaperonas Ssa1p y Ssa2p disminuye, en cierta manera, el número de inclusiones fluorescentes WH1-R-mCherry con respecto a la estirpe silvestre de *S. cerevisiae*. En ésta, los agregados parecen disponerse adyacentes a la membrana y alrededor de las vacuolas, donde se localizan parte de los priones en levaduras (compartimento IPOD) (Tyedmers y col., 2010b) (**Figura 5, 35**). Se sabe que la delección de  $\Delta ssa1$  genera en Sup35p agregados de mayor tamaño con respecto a la estirpe WT, debido a un aumento del número de los polímeros que están presentes en dichos agregados, al igual que sucede tras la inhibición de Hsp104 (Song y col., 2005).

La doble delección  $\Delta ssa1-2$  puede generar agregados intracelulares de mayor tamaño y en menor número, los cuales se diluyen durante la proliferación celular provocando finalmente la curación. Es necesaria la realización de experimentos adicionales para poder afirmar que las chaperonas Hsp70 desempeñan un papel esencial en la propagación de las proteínas híbridas. Se observa que, al contrario que en bacterias, los priones quiméricos de Sup35-WH1-R no son tóxicos en levaduras. La menor agregación detectada por microscopía puede ser resultado de una toxicidad aparente menor, incluso en fondos  $\Delta ssa1-2$ , esto podría dar razón de la reducida toxicidad de las mismas (y en general de los priones Q/N) en levaduras.

Estos resultados preliminares no descartan que las chaperonas de la familia Hsp70 puedan tener un papel crucial en el mantenimiento de  $[REP-PSI^+]$ , al igual que su ortólogo DnaK lo tiene en bacterias sobre el prionoide RepA-WH1(A31V). Las chaperonas Hsp70 pueden pues desempeñar una función determinante en priones cuyas secuencias amiloidogénicas tengan una composición aminoacídica de naturaleza hidrofóbica, ya que sobre éstos la disgregasa Hsp104 no parece ejercer un papel directo en la generación de partículas transmisibles. La existencia de múltiples genes *HSP70* parálogos en levaduras (Albanèse y col., 2006) plantea el reto de entender su contribución diferencial a la amiloidogénesis.

---

## **VII. CONCLUSIONES**

---

El trabajo descrito en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes conclusiones:

- La proteína RepA-WH1(A31V), que había sido previamente caracterizada *in vitro*, tiene naturaleza de prionoide en *E. coli*:
  - La proteína WH1(A31V) agrega formando inclusiones amiloides.
  - Los agregados son heredados de célula madre a hija verticalmente, a modo de pequeñas partículas transmisibles. Los propagones heredados reclutan precursores solubles y se multiplican por fragmentación.
  - Las proteínas amiloides no son capaces de transferirse de célula a célula (horizontalmente) por lo que no son infectivas.
- Los agregados de RepA-WH1 generan una proteinopatía en *E. coli*, ya que provocan que el tiempo de generación en la división bacteriana se multiplique hasta por cinco veces. Hasta la fecha no se conoce una tasa tan alta de toxicidad para un agregado intracelular bacteriano.
- La forma diferente de los agregados (elongados frente a globulares), su alta proteotoxicidad y baja colocación con IbpA, diferencian claramente al prionoide RepA-WH1(A31V) de los cuerpos de inclusión convencionales.
- Si se observa la dinámica del agregado RepA-WH1(A31V) durante generaciones mediante microfluídica, se aprecia la generación de dos estirpes del prionoide (globular y elongada), que se mantienen de manera estable y generan un fenotipo característico en la proliferación celular. Además tales variantes pueden interconvertirse.
- Tal y como se había descrito *in vitro*, la secuencia efectora de ADN (*opsp*) es capaz de promover la agregación amiloide de WH1(A31V) en *E. coli*, permitiendo desarrollar un dispositivo amiloidogénico modulable.
- La chaperona molecular Hsp70 (DnaK) desempeña un papel esencial en la generación de las partículas amiloides pues tanto su inhibición como su sobreexpresión alteran la dinámica del prionoide RepA-WH1(A31V).
- Hsp104 (ClpB) no parece participar en la propagación de RepA-WH1(A31V).
- Las quimeras Sup35\_WH1 en *S. cerevisiae* se comportan como módulos ortogonales:
  - Siempre que incluyan al menos dos repeticiones del péptido amiloidogénico, generan en *S. cerevisiae* priones [*REP-PSI*<sup>+</sup>] que son plenamente funcionales en ensayos estándar de amiloidosis.

- Tal y como se observa para el prionoide en *E. coli* con respecto a ClpB, la propagación de los priones [*REP-PSI*<sup>+</sup>] es independiente de la chaperona Hsp104, cuyo papel podría estar desempeñado por la familia Hsp70.
- El prionoide mínimo sintético RepA-WH1(A31V) ilustra cuestiones clave de la biología de los amiloides, siendo por lo tanto un sistema óptimo para abordar un programa de Biología Sintética *bottom-up* con claras implicaciones biotecnológicas: diseñar y construir dispositivos que ensamblados en módulos autónomos sirvan como herramientas útiles para dotar a los microorganismos con funciones nuevas o mejoradas.

---

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**

---

- Acebron SP, Martin I, del Castillo U, Moro F y Muga A (2009) DnaK-mediated association of ClpB to protein aggregates. A bichaperone network at the aggregate surface. *FEBS Lett* **583**:2991-6.
- Aguilaniu H, Gustafsson L, Rigoulet M y Nystrom T (2003) Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science* **299**:1751-3.
- Albanèse V, Yam AY, Baughman J, Parnot C y Frydman J (2006) Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell* **124**:75-88.
- Aguzzi A (2009) Cell biology: Beyond the prion principle. *Nature* **459**:924-5.
- Aguzzi A y Rajendran L (2009) The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* **64**:783-90.
- Alberti S, Halfmann R, King O, Kapila A y Lindquist S (2009) A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins. *Cell* **137**:146-58.
- Alix JH y Guerin MF (1993) Mutant DnaK chaperones cause ribosome assembly defects in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:9725-9.
- Allen KD, Wegrzyn RD, Chernova TA, Muller S, Newnam GP, Winslett PA, Wittich KB, Wilkinson KD y Chernoff YO (2005) Hsp70 chaperones as modulators of prion life cycle: novel effects of Ssa and Ssb on the *Saccharomyces cerevisiae* prion [PSI<sup>+</sup>]. *Genetics* **169**:1227-42.
- Allen SP, Polazzi JO, Gierse JK y Easton AM (1992) Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**:6938-47.
- Anand SP y Khan SA (2010) Plasmid segregation: birds of a feather try not to flock together. *J Bacteriol* **192**:1171-4.
- Andersen ES, Dong M, Nielsen MM, Jahn K, Subramani R, Mamdouh W, Golas MM, Sander B, Stark H, Oliveira CL, Pedersen JS, Birkedal V, Besenbacher F, Gothelf KV y Kjems J (2009) Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature* **459**:73-6.
- Angot E y Brundin P (2009) Dissecting the potential molecular mechanisms underlying  $\alpha$ -synuclein cell-to-cell transfer in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* **15 Suppl 3**:S143-7.
- Arnqvist A, Olsen A y Normark S (1994)  $\sigma$ S-dependent growth-phase induction of the *csgBA* promoter in *Escherichia coli* can be achieved *in vivo* by  $\sigma$ 70 in the absence of the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol* **13**:1021-32.
- Auluck PK, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM y Bonini NM (2002) Chaperone suppression of  $\alpha$ -synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science* **295**:865-8.
- Arranz R, Mercado G, Martin-Benito J, Giraldo R, Monasterio O, Lagos R y Valpuesta JM (2012) Structural characterization of microcin E492 amyloid formation: Identification of the precursors. *J Struct Biol* **178**:54-60.
- Bagriantsev SN, Kushnirov VV y Liebman SW (2006) Analysis of amyloid aggregates using agarose gel electrophoresis. *Methods Enzymol* **412**:33-48.
- Baldwin AJ, Knowles TP, Tartaglia GG, Fitzpatrick AW, Devlin GL, Shammass SL, Waudby CA, Mossuto MF, Meehan S, Gras SL, Christodoulou J, Anthony-Cahill SJ, Barker PD, Vendruscolo M y Dobson CM (2011) Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *J Am Chem Soc* **133**:14160-3.
- Bauer PO y Nukina N (2009) The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *J Neurochem* **110**:1737-65.
- Bennett MJ, Sawaya MR y Eisenberg D (2006) Deposition diseases and 3D domain swapping. *Structure* **14**:811-24.
- Ben-Zvi A, De Los Ríos P, Dietler G y Goloubinoff P (2004) Active solubilization and refolding of stable protein aggregates by cooperative unfolding action of individual hsp70 chaperones. *J Biol Chem* **279**:37298-303.
- Ben-Zvi AP y Goloubinoff P (2001) Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *J Struct Biol* **135**:84-93.

- Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B y Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-62.
- Boehr DD, Nussinov R y Wright PE (2009) The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nat Chem Biol* **5**:789-96.
- Bogosian G, Bilyeu K y O'Neil JP (1993) Genome rearrangements by residual *IS10* elements in strains of *Escherichia coli* K-12 which had undergone *Tn10* mutagenesis and fusaric acid selection. *Gene* **133**:17-22.
- Bolton DC, McKinley MP y Prusiner SB (1982) Identification of a protein that purifies with the *scrapie* prion. *Science* **218**:1309-11.
- Bredeche MF, Ehrlich SD y Michel B (2001) Viability of *rep recA* mutants depends on their capacity to cope with spontaneous oxidative damage and on the DnaK chaperone protein. *J Bacteriol* **183**:2165-71.
- Brown JC y Lindquist S (2009) A heritable switch in carbon source utilization driven by an unusual yeast prion. *Genes Dev* **23**:2320-32.
- Buchberger A, Gassler CS, Buttner M, McMacken R y Bukau B (1999) Functional defects of the DnaK756 mutant chaperone of *Escherichia coli* indicate distinct roles for amino- and carboxyl-terminal residues in substrate and co-chaperone interaction and interdomain communication. *J Biol Chem* **274**:38017-26.
- Bukau B, Deuerling E, Pfund C y Craig EA (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101**:119-22.
- Bukau B, Weissman J y Horwich A (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **125**:443-51.
- Butterfield SM y Lashuel HA (2010) Amyloidogenic protein-membrane interactions: mechanistic insight from model systems. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**:5628-54.
- Carrió MM y Villaverde A (2005) Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. *J Bacteriol* **187**:3599-601.
- Castilla J, Saa P, Hetz C y Soto C (2005) *In vitro* generation of infectious *scrapie* prions. *Cell* **121**:195-206.
- Chang L, Miyata Y, Ung PM, Bertelsen EB, McQuade TJ, Carlson HA, Zuiderweg ER y Gestwicki JE (2011) Chemical screens against a reconstituted multiprotein complex: myricetin blocks DnaJ regulation of DnaK through an allosteric mechanism. *Chem Biol* **18**:210-21
- Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, Normark S y Hultgren SJ (2002) Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **295**:851-5.
- Chernoff YO, Lindquist SL, Ono B, Inge-Vechtormov SG y Liebman SW (1995) Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*psi*<sup>+</sup>]. *Science* **268**:880-4.
- Chien P, Weissman JS y DePace AH (2004) Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Annu Rev Biochem* **73**:617-56.
- Chiti F y Dobson CM (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* **75**:333-66.
- Chiti F y Dobson CM (2009) Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat Chem Biol* **5**:15-22.
- Cobb NJ y Surewicz WK (2009) Prion diseases and their biochemical mechanisms. *Biochemistry* **48**:2574-85.
- Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, Kelly JW y Dillin A (2006) Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science* **313**:1604-10.
- Colby DW y Prusiner SB (2011) *De novo* generation of prion strains. *Nat Rev Microbiol* **9**:771-7.
- Collinson SK, Clouthier SC, Doran JL, Baner PA y Kay WW (1996) *Salmonella enteritidis agfBAC* operon encoding thin, aggregative fimbriae. *J Bacteriol* **178**:662-7.
- Collinge J y Clarke AR (2007) A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* **318**:930-6.



- Cordeiro Y, Machado F, Juliano L, Juliano MA, Brentani RR, Foguel D y Silva JL (2001) DNA converts cellular prion protein into the  $\beta$ -sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J Biol Chem* **276**:49400-9.
- Coustou V, Deleu C, Saupe SJ y Begueret J (1999) Mutational analysis of the [*Het-s*] prion analog of *Podospora anserina*. A short N-terminal peptide allows prion propagation. *Genetics* **153**:1629-40.
- Cox BS, Byrne LJ y Tuite MF (2007) Prion stability. *Prion* **1**:170-8.
- Cox BS, Tuite MF y Mundy CJ (1980) Reversion from suppression to nonsuppression in SUQ5 [*PSI<sup>+</sup>*] strains of yeast: the classification of mutations. *Genetics* **95**:589-609.
- Cullin C y Minvielle-Sebastia L (1994) Multipurpose vectors designed for the fast generation of N- or C-terminal epitope-tagged proteins. *Yeast* **10**:105-12.
- DasGupta S, Mukhopadhyay G, Papp PP, Lewis MS y Chatteraj DK (1993) Activation of DNA binding by the monomeric form of the P1 replication initiator RepA by heat shock proteins DnaJ and DnaK. *J Mol Biol* **232**:23-34.
- Dedmon MM, Christodoulou J, Wilson MR y Dobson CM (2005) Heat shock protein 70 inhibits  $\alpha$ -synuclein fibril formation via preferential binding to prefibrillar species. *J Biol Chem* **280**:14733-40.
- de Groot NS, Sabate R y Ventura S (2009) Amyloids in bacterial inclusion bodies. *Trends Biochem Sci* **34**:408-16.
- De Rooij KE, Dorsman JC, Smoor MA, Den Dunnen JT y Van Ommen GJ (1996) Subcellular localization of the Huntington's disease gene product in cell lines by immunofluorescence and biochemical subcellular fractionation. *Hum Mol Genet* **5**:1093-9.
- Deleault NR, Harris BT, Rees JR y Supattapone S (2007) Formation of native prions from minimal components *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:9741-6.
- Deleault NR, Kascsak R, Geoghegan JC y Supattapone S (2010) Species-dependent differences in cofactor utilization for formation of the protease-resistant prion protein *in vitro*. *Biochemistry* **49**:3928-34.
- Derkatch IL, Chernoff YO, Kushnirov VV, Inge-Vechtomov SG y Liebman SW (1996) Genesis and variability of [*PSI<sup>+</sup>*] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **144**:1375-86.
- De Palmenaer D, Siguier P y Mahillon J (2008) *IS4* family goes genomic. *BMC Evol Biol* **8**:18.
- Destoumieux-Garzón D, Thomas X, Santamaria M, Goulard C, Barthelemy M, Boscher B, Bessin Y, Molle G, Pons AM, Letellier L, Peduzzi J y Rebuffat S (2003) Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **49**:1031-41.
- Diamant S, Ben-Zvi AP, Bukau B y Goloubinoff P (2000) Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery. *J Biol Chem* **275**:21107-13.
- Díaz-López T, Dávila-Fajardo C, Blaesing F, Lillo MP y Giraldo R (2006) Early events in the binding of the pPS10 replication protein RepA to single iteron and operator DNA sequences. *J Mol Biol* **364**:909-20.
- Díaz-López T, Lages-Gonzalo M, Serrano-López A, Alfonso C, Rivas G, Díaz-Orejas R y Giraldo R (2003) Structural changes in RepA, a plasmid replication initiator, upon binding to origin DNA. *J Biol Chem* **278**:18606-16.
- Dobson CM (1999) Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci* **24**:329-32.
- Doyle SM y Wickner S (2009) Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends Biochem Sci* **34**:40-8.
- Eaglestone SS, Cox BS y Tuite MF (1999) Translation termination efficiency can be regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by environmental stress through a prion-mediated mechanism. *EMBO J* **18**:1974-81.
- Eichner T y Radford SE (2011a) A diversity of assembly mechanisms of a generic amyloid fold. *Mol Cell* **43**:8-18.
- Eichner T y Radford SE (2011b) Understanding the complex mechanisms of  $\beta$ 2-microglobulin amyloid assembly. *FEBS J* **278**:3868-83.

- Eisenberg D, Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Sambashivan S, Ivanova MI, Madsen AO y Riekel C (2006) The structural biology of protein aggregation diseases: Fundamental questions and some answers. *Acc Chem Res* **39**:568-75.
- Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED y Swain PS (2002) Stochastic gene expression in a single cell. *Science* **297**:1183-6.
- Epstein EA y Chapman MR (2008) Polymerizing the fibre between bacteria and host cells: the biogenesis of functional amyloid fibres. *Cell Microbiol* **10**:1413-20.
- Erjavec N, Larsson L, Grantham J y Nystrom T (2007) Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. *Genes Dev* **21**:2410-21.
- Evans CG, Wisen S y Gestwicki JE (2006) Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid  $\beta$ -(1-42) aggregation *in vitro*. *J Biol Chem* **281**:33182-91
- Ferenci T, Zhou Z, Betteridge T, Ren Y, Liu Y, Feng L, Reeves PR y Wang L (2009) Genomic sequencing reveals regulatory mutations and recombinational events in the widely used MC4100 lineage of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **191**:4025-9.
- Fernández-Tresguerres ME, de la Espina SM, Gasset-Rosa F y Giraldo R (2010) A DNA-promoted amyloid proteinopathy in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **77**:1456-69.
- Fernández-Tresguerres ME, Martin M, García de Viedma D, Giraldo R y Díaz-Orejas R (1995) Host growth temperature and a conservative amino acid substitution in the replication protein of pPS10 influence plasmid host range. *J Bacteriol* **177**:4377-84.
- Ferreira PC, Ness F, Edwards SR, Cox BS y Tuite MF (2001) The elimination of the yeast [*PSI<sup>+</sup>*] prion by guanidine hydrochloride is the result of Hsp104 inactivation. *Mol Microbiol* **40**:1357-69.
- Fowler DM, Koulov AV, Alory-Jost C, Marks MS, Balch WE y Kelly JW (2006) Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol* **4**:e6.
- Frieden C (2007) Protein aggregation processes: In search of the mechanism. *Protein Sci* **16**:2334-44.
- Garí E, Piedrafita L, Aldea M y Herrero E (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**:837-48.
- Garrity SJ, Sivanathan V, Dong J, Lindquist S y Hochschild A (2010) Conversion of a yeast prion protein to an infectious form in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:10596-601.
- Gasset-Rosa F, Díaz-López T, Lurz R, Prieto A, Fernández-Tresguerres ME y Giraldo R (2008a) Negative regulation of pPS10 plasmid replication: origin pairing by zipping-up DNA-bound RepA monomers. *Mol Microbiol* **68**:560-72.
- Gasset-Rosa F, Mate MJ, Davila-Fajardo C, Bravo J y Giraldo R (2008b) Binding of sulphonated indigo derivatives to RepA-WH1 inhibits DNA-induced protein amyloidogenesis. *Nucleic Acids Res* **36**:2249-56.
- Gerstel U y Romling U (2003) The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol* **154**:659-67.
- Giraldo R (2007) Defined DNA sequences promote the assembly of a bacterial protein into distinct amyloid nanostructures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:17388-93.
- Giraldo R (2010) Amyloid assemblies: protein legos at a crossroads in bottom-up synthetic biology. *ChemBiochem* **11**:2347-57.
- Giraldo R, Andreu JM y Díaz-Orejas R (1998) Protein domains and conformational changes in the activation of RepA, a DNA replication initiator. *EMBO J* **17**:4511-26.
- Giraldo R y Díaz-Orejas R (2001) Similarities between the DNA replication initiators of Gram-negative bacteria plasmids (RepA) and eukaryotes (Orc4p)/archaea (Cdc6p). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4938-43.
- Giraldo R, Fernández-Tornero C, Evans PR, Díaz-Orejas R y Romero A (2003) A conformational switch between transcriptional repression and replication initiation in the RepA dimerization domain. *Nat Struct Biol* **10**:565-71.

- Giraldo R y Fernández-Tresguerres ME (2004) Twenty years of the pPS10 replicon: insights on the molecular mechanism for the activation of DNA replication in iteron-containing bacterial plasmids. *Plasmid* **52**:69-83.
- Giraldo R, Moreno-Díaz de la Espina S, Fernández-Tresguerres ME y Gasset-Rosa F (2011) RepA-WH1 prionoid: a synthetic amyloid proteinopathy in a minimalist host. *Prion* **5**:60-4.
- Giraldo-Suárez R, Fernández-Tresguerres E, Díaz-Orejas R, Malki A y Kohiyama M (1993) The heat-shock DnaK protein is required for plasmid R1 replication and it is dispensable for plasmid ColE1 replication. *Nucleic Acids Res* **21**:5495-9.
- Glover JR, Kowal AS, Schirmer EC, Patino MM, Liu JJ y Lindquist S (1997) Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [*PSI*<sup>+</sup>], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*. *Cell* **89**:811-9.
- Glover JR y Lindquist S (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**:73-82.
- Goldschmidt L, Teng PK, Riek R y Eisenberg D (2010) Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:3487-92.
- Goloubinoff P, Mogk A, Zvi AP, Tomoyasu T y Bukau B (1999) Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a chaperone network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:13732-7.
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR y Hanahan D (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:4645-9.
- Greenwald J y Riek R (2010) Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure* **18**:1244-60.
- Halfmann R y Lindquist S (2010) Epigenetics in the extreme: prions and the inheritance of environmentally acquired traits. *Science* **330**:629-32.
- Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, Olsen A y Normark S (1995) Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **18**:661-70.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-80.
- Harris DA (1999) Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev* **12**:429-44.
- Haslberger T, Bukau B y Mogk A (2010) Towards a unifying mechanism for ClpB/Hsp104-mediated protein disaggregation and prion propagation. *Biochem Cell Biol* **88**:63-75.
- Hegde ML, Vasudevaraju P y Rao KJ (2010) DNA induced folding/fibrillation of  $\alpha$ -synuclein: new insights in Parkinson's disease. *Front Biosci* **15**:418-36.
- Heinrich SU y Lindquist S (2011) Protein-only mechanism induces self-perpetuating changes in the activity of neuronal *Aplysia* cytoplasmic polyadenylation element binding protein (CPEB). *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:2999-3004.
- Hoshino T, Murao N, Namba T, Takehara M, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Matsushima T, Suzuki T y Mizushima T (2011) Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *J Neurosci* **31**:5225-34.
- Irvine GB, El-Agnaf OM, Shankar GM y Walsh DM (2008) Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mol Med* **14**:451-64.
- Jiang J, Maes EG, Taylor AB, Wang L, Hinck AP, Lafer EM y Sousa R (2007) Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70. *Mol Cell* **28**:422-33.
- Jun S y Wright A (2010) Entropy as the driver of chromosome segregation. *Nat Rev Microbiol* **8**:600-7.
- Jung G y Masison DC (2001) Guanidine hydrochloride inhibits Hsp104 activity *in vivo*: a possible explanation for its effect in curing yeast prions. *Curr Microbiol* **43**:7-10.
- Jurgen B, Breitenstein A, Urlacher V, Buttner K, Lin H, Hecker M, Schweder T y Neubauer P (2010) Quality control of inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **9**:41.
- Kaiser C, Michaelis S y Mitchell A (1994) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor laboratory Press Cold Spring Harbor, NY.

- Kaganovich D, Kopito R y Frydman J (2008) Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* **454**:1088-95.
- Kawai-Noma S, Pack CG, Kojidani T, Asakawa H, Hiraoka Y, Kinjo M, Haraguchi T, Taguchi H y Hirata A (2010) *In vivo* evidence for the fibrillar structures of Sup35 prions in yeast cells. *J Cell Biol* **190**:223-31.
- Kikuchi Y, Shimatake H y Kikuchi A (1988) A yeast gene required for the G1-to-S transition encodes a protein containing an A-kinase target site and GTPase domain. *EMBO J* **7**:1175-82.
- Kim SY, Sharma S, Hoskins JR y Wickner S (2002) Interaction of the DnaK and DnaJ chaperone system with a native substrate, P1 RepA. *J Biol Chem* **277**:44778-83.
- King CY, Tittmann P, Gross H, Gebert R, Aebi M y Wuthrich K (1997) Prion-inducing domain 2-114 of yeast Sup35 protein transforms *in vitro* into amyloid-like filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:6618-22.
- Klucken J, Shin Y, Masliah E, Hyman BT y McLean PJ (2004) Hsp70 Reduces  $\alpha$ -Synuclein Aggregation and Toxicity. *J Biol Chem* **279**:25497-502.
- Knowles TP y Buehler MJ (2011) Nanomechanics of functional and pathological amyloid materials. *Nat Nanotechnol* **6**:469-79.
- Kobayashi T, Manno A y Kakizuka A (2007) Involvement of valosin-containing protein (VCP)/p97 in the formation and clearance of abnormal protein aggregates. *Genes Cells* **12**:889-901.
- Kopito RR (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* **10**:524-30.
- Kovacs GG, Trabattoni G, Hainfellner JA, Ironside JW, Knight RS y Budka H (2002) Mutations of the prion protein gene phenotypic spectrum. *J Neurol* **249**:1567-82.
- Krammer C, Kryndushkin D, Suhre MH, Kremmer E, Hofmann A, Pfeifer A, Scheibel T, Wickner RB, Schatzl HM y Vorberg I (2009) The yeast Sup35NM domain propagates as a prion in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:462-7.
- Krishnan R y Lindquist SL (2005) Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity. *Nature* **435**:765-72.
- Krobitsch S y Lindquist S (2000) Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:1589-94.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
- Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK y Hartl FU (1992) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356**:683-9.
- Laskowski RA, Gerick F y Thornton JM (2009) The structural basis of allosteric regulation in proteins. *FEBS Lett* **583**:1692-8.
- Lee JN, Park C y Whitesides GM (2003) Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices. *Anal Chem* **75**:6544-54.
- Lewandowska A, Matuszewska M y Liberek K (2007) Conformational properties of aggregated polypeptides determine ClpB-dependence in the disaggregation process. *J Mol Biol* **371**:800-11.
- Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP, Rehncrona S, Bjorklund A, Widner H, Revesz T, Lindvall O y Brundin P (2008) Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* **14**:501-3.
- Li L y Lindquist S (2000) Creating a protein-based element of inheritance. *Science* **287**:661-4.
- Lian HY, Jiang Y, Zhang H, Jones GW y Perrett S (2006) The yeast prion protein Ure2: structure, function and folding. *Biochim Biophys Acta* **1764**:535-45.
- Liebmman SW y Derkatch IL (1999) The yeast [PSI<sup>+</sup>] prion: making sense of nonsense. *J Biol Chem* **274**:1181-4.
- Lindner AB, Madden R, Demarez A, Stewart EJ y Taddei F (2008) Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:3076-81.

- Liu JJ y Lindquist S (1999) Oligopeptide-repeat expansions modulate 'protein-only' inheritance in yeast. *Nature* **400**:573-6.
- Liu JJ, Sondheimer N y Lindquist SL (2002) Changes in the middle region of Sup35 profoundly alter the nature of epigenetic inheritance for the yeast prion [*PSI<sup>+</sup>*]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99 Suppl 4**:16446-53.
- Luk KC, Mills IP, Trojanowski JQ y Lee VM (2008) Interactions between Hsp70 and the hydrophobic core of  $\alpha$ -synuclein inhibit fibril assembly. *Biochemistry* **47**:12614-25.
- Lund PM y Cox BS (1981) Reversion analysis of [*psi*] mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genet Res* **37**:173-82.
- Maestro B, Sanz JM, Díaz-Orejas R y Fernández-Tresguerres E (2003) Modulation of pPS10 host range by plasmid-encoded RepA initiator protein. *J Bacteriol* **185**:1367-75.
- Maji SK, Perrin MH, Sawaya MR, Jessberger S, Vadodaria K, Rissman RA, Singru PS, Nilsson KP, Simon R, Schubert D, Eisenberg D, Rivier J, Sawchenko P, Vale W y Riek R (2009) Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science* **325**:328-32.
- Mange A, Crozet C, Lehmann S y Beranger F (2004) *Scrapie*-like prion protein is translocated to the nuclei of infected cells independently of proteasome inhibition and interacts with chromatin. *J Cell Sci* **117**:2411-6.
- Martínez-Alonso M, González-Montalbán N, García-Fruitos E y Villaverde A (2009) Learning about protein solubility from bacterial inclusion bodies. *Microb Cell Fact* **8**:4.
- Masel J, Jansen VA y Nowak MA (1999) Quantifying the kinetic parameters of prion replication. *Biophys Chem* **77**:139-52.
- Mathur V, Hong JY y Liebman SW (2009) Ssa1 overexpression and [*PIN<sup>+</sup>*] variants cure [*PSI<sup>+</sup>*] by dilution of aggregates. *J Mol Biol* **390**:155-67.
- Mathur V, Taneja V, Sun Y y Liebman SW (2010) Analyzing the birth and propagation of two distinct prions, [*PSI<sup>+</sup>*] and [*Het-s*]<sub>y</sub>, in yeast. *Mol Biol Cell* **21**:1449-61.
- Maurer-Stroh S, Debulpaep M, Kuemmerer N, López de la Paz M, Martins IC, Reumers J, Morris KL, Copland A, Serpell L, Serrano L, Schymkowitz JW y Rousseau F (2010) Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices. *Nat Methods* **7**:237-42.
- Mayer MP (2010) Gymnastics of molecular chaperones. *Mol Cell* **39**:321-31.
- Mayer MP y Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**:670-84.
- Mayer MP, Schroder H, Rudiger S, Paal K, Laufen T y Bukau B (2000) Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nat Struct Biol* **7**:586-93.
- Miners JS, Baig S, Palmer J, Palmer LE, Kehoe PG y Love S (2008) A $\beta$ -degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* **18**:240-52.
- Mogk A, Deuerling E, Vorderwulbecke S, Vierling E y Bukau B (2003) Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Mol Microbiol* **50**:585-95.
- Moreno-del Álamo M, Sánchez-Gorostiaga A, Serrano AM, Prieto A, Cuellar J, Martin-Benito J, Valpuesta JM y Giraldo R (2010) Structural analysis of the interactions between hsp70 chaperones and the yeast DNA replication protein Orc4p. *J Mol Biol* **403**:24-39.
- Munch C, O'Brien J y Bertolotti A (2011) Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:3548-53.
- Muchowski PJ y Wacker JL (2005) Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci* **6**:11-22.
- Nakamura A, Wada C y Miki K (2007) Structural basis for regulation of bifunctional roles in replication initiator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:18484-9.

- Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Madsen AO, Riekel C, Grothe R y Eisenberg D (2005) Structure of the cross- $\beta$  spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **435**:773-8.
- Ness F, Ferreira P, Cox BS y Tuite MF (2002) Guanidine hydrochloride inhibits the generation of prion "seeds" but not prion protein aggregation in yeast. *Mol Cell Biol* **22**:5593-605.
- Newnam GP, Birchmore JL y Chernoff YO (2011) Destabilization and recovery of a yeast prion after mild heat shock. *J Mol Biol* **408**:432-48.
- Newnam GP, Wegrzyn RD, Lindquist SL y Chernoff YO (1999) Antagonistic interactions between yeast chaperones Hsp104 and Hsp70 in prion curing. *Mol Cell Biol* **19**:1325-33.
- Nieto C, Giraldo R, Fernández-Tresguerres E y Díaz R (1992) Genetic and functional analysis of the basic replicon of pPS10, a plasmid specific for *Pseudomonas* isolated from *Pseudomonas syringae patovar savastanoi*. *J Mol Biol* **223**:415-26.
- Oh J, Kim JG, Jeon E, Yoo CH, Moon JS, Rhee S y Hwang I (2007) Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. *J Biol Chem* **282**:13601-9.
- Olzscha H, Schermann SM, Woerner AC, Pinkert S, Hecht MH, Tartaglia GG, Vendruscolo M, Hayer-Hartl M, Hartl FU y Vabulas RM (2011) Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. *Cell* **144**:67-78.
- Osherovich LZ, Cox BS, Tuite MF y Weissman JS (2004) Dissection and design of yeast prions. *PLoS Biol* **2**:E86.
- Parham SN, Resende CG y Tuite MF (2001) Oligopeptide repeats in the yeast protein Sup35p stabilize intermolecular prion interactions. *EMBO J* **20**:2111-9.
- Park SM, Jung HY, Kim TD, Park JH, Yang CH y Kim J (2002) Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of asynuclein, a molecular chaperone. *J Biol Chem* **277**:28512-20.
- Parsell DA, Kowal AS, Singer MA y Lindquist S (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**:475-8.
- Patino MM, Liu JJ, Glover JR y Lindquist S (1996) Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science* **273**:622-6.
- Patterson KR, Ward SM, Combs B, Voss K, Kanaan NM, Morfini G, Brady ST, Gamblin TC y Binder LI (2011) Heat shock protein 70 prevents both tau aggregation and the inhibitory effects of preexisting tau aggregates on fast axonal transport. *Biochemistry* **50**:10300-10.
- Paushkin SV, Kushnirov VV, Smirnov VN y Ter-Avanesyan MD (1997) *In vitro* propagation of the prion-like state of yeast Sup35 protein. *Science* **277**:381-3.
- Pawar AP, Dubay KF, Zurdo J, Chiti F, Vendruscolo M y Dobson CM (2005) Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *J Mol Biol* **350**:379-92.
- Perrett S y Jones GW (2008) Insights into the mechanism of prion propagation. *Curr Opin Struct Biol* **18**:52-9.
- Pogliano J, Ho TQ, Zhong Z y Helinski DR (2001) Multicopy plasmids are clustered and localized in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4486-91.
- Perutz MF, Staden R, Moens L y De Baere I (1993) Polar zippers. *Curr Biol* **3**:249-53.
- Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause *scrapie*. *Science* **216**:136-44.
- Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:13363-83.
- Raffen R, Dieckman LJ, Szpunar M, Wunschl C, Pokkuluri PR, Dave P, Wilkins Stevens P, Cai X, Schiffer M y Stevens FJ (1999) Physicochemical consequences of amino acid variations that contribute to fibril formation by immunoglobulin light chains. *Protein Sci* **8**:509-17.
- Reddy PS y Housman DE (1997) The complex pathology of trinucleotide repeats. *Curr Opin Cell Biol* **9**:364-72.

- Rogoza T, Goginashvili A, Rodionova S, Ivanov M, Viktorovskaya O, Rubel A, Volkov K y Mironova L (2010) Non-Mendelian determinant [*ISP<sup>+</sup>*] in yeast is a nuclear-residing prion form of the global transcriptional regulator Sfp1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:10573-7.
- Rokney A, Shagan M, Kessel M, Smith Y, Rosenshine I y Oppenheim AB (2009) *E. coli* transports aggregated proteins to the poles by a specific and energy-dependent process. *J Mol Biol* **392**:589-601.
- Ross ED, Minton A y Wickner RB (2005) Prion domains: sequences, structures and interactions. *Nat Cell Biol* **7**:1039-44.
- Rousseau F, Serrano L y Schymkowitz JW (2006) How evolutionary pressure against protein aggregation shaped chaperone specificity. *J Mol Biol* **355**:1037-47.
- Sambrook J y Pollack R (1974) Basic methodology for cell culture-cell transformation. *Methods Enzymol* **32**:583-92.
- Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, Apostol MI, Thompson MJ, Balbirnie M, Wiltzius JJ, McFarlane HT, Madsen AO, Riekel C y Eisenberg D (2007) Atomic structures of amyloid cross- $\beta$  spines reveal varied steric zippers. *Nature* **447**:453-7.
- Serio TR y Lindquist SL (1999) [*PSI<sup>+</sup>*]: an epigenetic modulator of translation termination efficiency. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**:661-703.
- Serio TR y Lindquist SL (2000) Protein-only inheritance in yeast: something to get [*PSI<sup>+</sup>*]-ched about. *Trends Cell Biol* **10**:98-105.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE y Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**:1567-72.
- Sharma D y Masison DC (2011) Single methyl group determines prion propagation and protein degradation activities of yeast heat shock protein (Hsp)-70 chaperones Ssa1p and Ssa2p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:13665-70.
- Shewmaker F, Wickner RB y Tycko R (2006) Amyloid of the prion domain of Sup35p has an in-register parallel  $\beta$ -sheet structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:19754-9.
- Shorter J (2011) The mammalian disaggregase machinery: Hsp110 synergizes with Hsp70 and Hsp40 to catalyze protein disaggregation and reactivation in a cell-free system. *PLoS One* **6**:e26319.
- Shorter J y Lindquist S (2004) Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers. *Science* **304**:1793-7.
- Shorter J y Lindquist S (2005) Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. *Nat Rev Genet* **6**:435-50.
- Shorter J y Lindquist S (2006) Destruction or potentiation of different prions catalyzed by similar Hsp104 remodeling activities. *Mol Cell* **23**:425-38.
- Shorter J y Lindquist S (2008) Hsp104, Hsp70 and Hsp40 interplay regulates formation, growth and elimination of Sup35 prions. *EMBO J* **27**:2712-24.
- Si K, Choi YB, White-Grindley E, Majumdar A y Kandel ER (2010) *Aplysia* CPEB can form prion-like multimers in sensory neurons that contribute to long-term facilitation. *Cell* **140**:421-35.
- Si K, Giustetto M, Etkin A, Hsu R, Janisiewicz AM, Miniaci MC, Kim JH, Zhu H y Kandel ER (2003) A neuronal isoform of CPEB regulates local protein synthesis and stabilizes synapse-specific long-term facilitation in *aplysia*. *Cell* **115**:893-904.
- Silva JL, Lima LM, Foguel D y Cordeiro Y (2008) Intriguing nucleic-acid-binding features of mammalian prion protein. *Trends Biochem Sci* **33**:132-40.
- Silva JL, Vieira TC, Gomes MP, Bom AP, Lima LM, Freitas MS, Ishimaru D, Cordeiro Y y Foguel D (2010) Ligand binding and hydration in protein misfolding: insights from studies of prion and p53 tumor suppressor proteins. *Acc Chem Res* **43**:271-9.
- Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF y Caughey B (2005) The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**:257-61.

- Sindi SS y Serio TR (2009) Prion dynamics and the quest for the genetic determinant in protein-only inheritance. *Curr Opin Microbiol* **12**:623-30.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J y Gwinn-Hardy K (2003)  $\alpha$ -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* **302**:841.
- Sikorski P y Atkins E (2005) New model for crystalline polyglutamine assemblies and their connection with amyloid fibrils. *Biomacromolecules* **6**:425-32.
- Song Y, Wu YX, Jung G, Tutar Y, Eisenberg E, Greene LE y Masison DC (2005) Role for Hsp70 chaperone in *Saccharomyces cerevisiae* prion seed replication. *Eukaryot Cell* **4**:289-97.
- Soti C, Pal C, Papp B y Csermely P (2005) Molecular chaperones as regulatory elements of cellular networks. *Curr Opin Cell Biol* **17**:210-5.
- Soto C, Estrada L y Castilla J (2006) Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. *Trends Biochem Sci* **31**:150-5.
- Stefani M y Dobson CM (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med (Berl)* **81**:678-99.
- Stewart EJ, Madden R, Paul G y Taddei F (2005) Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS Biol* **3**:e45.
- Stohr J, Weinmann N, Wille H, Kaimann T, Nagel-Steger L, Birkmann E, Panza G, Prusiner SB, Eigen M y Riesner D (2008) Mechanisms of prion protein assembly into amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:2409-14.
- Sweeny EA y Shorter J (2008) Prion proteostasis: Hsp104 meets its supporting cast. *Prion* **2**:135-40.
- Tanaka M, Collins SR, Toyama BH y Weissman JS (2006) The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* **442**:585-9.
- Tanaka M, Kim YM, Lee G, Junn E, Iwatsubo T y Mouradian MM (2004) Aggresomes formed by  $\alpha$ -synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *J Biol Chem* **279**:4625-31.
- Taneja V, Maddelein ML, Talarek N, Saupe SJ y Liebman SW (2007) A non-Q/N-rich prion domain of a foreign prion, [*Het-s*], can propagate as a prion in yeast. *Mol Cell* **27**:67-77.
- Tank EM, Harris DA, Desai AA y True HL (2007) Prion protein repeat expansion results in increased aggregation and reveals phenotypic variability. *Mol Cell Biol* **27**:5445-55.
- Tek V y Zolkiewski M (2002) Stability and interactions of the amino-terminal domain of ClpB from *Escherichia coli*. *Protein Sci* **11**:1192-8.
- Ter-Avanesyan MD, Dagkesamanskaya AR, Kushnirov VV y Smirnov VN (1994) The *SUP35* omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [*psi<sup>+</sup>*] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **137**:671-6.
- Ter-Avanesyan MD, Kushnirov VV, Dagkesamanskaya AR, Didichenko SA, Chernoff YO, Inge-Vechtormov SG y Smirnov VN (1993) Deletion analysis of the *SUP35* gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein. *Mol Microbiol* **7**:683-92.
- Tessarz P, Schwarz M, Mogk A y Bukau B (2009) The yeast AAA+ chaperone Hsp104 is part of a network that links the actin cytoskeleton with the inheritance of damaged proteins. *Mol Cell Biol* **29**:3738-45.
- Tessier PM y Lindquist S (2009) Unraveling infectious structures, strain variants and species barriers for the yeast prion [*PSI<sup>+</sup>*]. *Nat Struct Mol Biol* **16**:598-605.
- Thomas JG y Baneyx F (1998) Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG In vivo. *J Bacteriol* **180**:5165-72.
- Tipton KA, Verges KJ y Weissman JS (2008) In vivo monitoring of the prion replication cycle reveals a critical role for Sis1 in delivering substrates to Hsp104. *Mol Cell* **32**:584-91.



- Toombs JA, Liss NM, Cobble KR, Ben-Musa Z y Ross ED (2011) [PSI<sup>+</sup>] maintenance is dependent on the composition, not primary sequence, of the oligopeptide repeat domain. *PLoS One* **6**:e21953.
- Toyama BH, Kelly MJ, Gross JD y Weissman JS (2007) The structural basis of yeast prion strain variants. *Nature* **449**:233-7.
- Toyama BH y Weissman JS (2011) Amyloid structure: conformational diversity and consequences. *Annu Rev Biochem* **80**:557-85.
- Treusch S, Cyr DM y Lindquist S (2009) Amyloid deposits: protection against toxic protein species? *Cell Cycle* **8**:1668-74.
- True HL, Berlin I y Lindquist SL (2004) Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits. *Nature* **431**:184-7.
- Tuite MF y Cox BS (2003) Propagation of yeast prions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:878-90.
- Tuite MF y Serio TR (2010) The prion hypothesis: from biological anomaly to basic regulatory mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**:823-33.
- Turoverov KK, Kuznetsova IM y Uversky VN (2010) The protein kingdom extended: ordered and intrinsically disordered proteins, their folding, supramolecular complex formation, and aggregation. *Prog Biophys Mol Biol* **102**:73-84.
- Tyedmers J, Mogk A y Bukau B (2010a) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**:777-88.
- Tyedmers J, Treusch S, Dong J, McCaffery JM, Bevis B y Lindquist S (2010b) Prion induction involves an ancient system for the sequestration of aggregated proteins and heritable changes in prion fragmentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:8633-8.
- Uversky VN y Fink AL (2004) Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim Biophys Acta* **1698**:131-53.
- Villar-Piqué A, de Groot NS, Sabate R, Acebron SP, Celaya G, Fernández-Busquets X, Muga A y Ventura S (2011) The Effect of Amyloidogenic Peptides on Bacterial Aging Correlates with Their Intrinsic Aggregation Propensity. *J Mol Biol.* doi: 10.1016/j.jmb.2011.12.014
- Villaverde A y Carrió MM (2003) Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett* **25**:1385-95.
- von der Haar T, Josse L, Wright P, Zenthon J y Tuite MF (2007) Development of a novel yeast cell-based system for studying the aggregation of Alzheimer's disease-associated A $\beta$  peptides *in vivo*. *Neurodegener Dis* **4**:136-47.
- Vyawahare S, Griffiths AD y Merten CA (2010) Miniaturization and parallelization of biological and chemical assays in microfluidic devices. *Chem Biol* **17**:1052-65.
- Wadsworth JD, Hill AF, Beck JA y Collinge J (2003) Molecular and clinical classification of human prion disease. *Br Med Bull* **66**:241-54.
- Wang F, Wang X, Yuan CG y Ma J (2010a) Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* **327**:1132-5.
- Wang L, Maji SK, Sawaya MR, Eisenberg D y Riek R (2008) Bacterial inclusion bodies contain amyloid-like structure. *PLoS Biol* **6**:e195.
- Wang L, Schubert D, Sawaya MR, Eisenberg D y Riek R (2010b) Multidimensional structure-activity relationship of a protein in its aggregated states. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**:3904-8.
- Wang P, Robert L, Pelletier J, Dang WL, Taddei F, Wright A y Jun S (2010c) Robust growth of *Escherichia coli*. *Curr Biol* **20**:1099-103.
- Warrick JM, Chan HY, Gray-Board GL, Chai Y, Paulson HL y Bonini NM (1999) Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nat Genet* **23**:425-8.

- Watt NT, Routledge MN, Wild CP y Hooper NM (2007) Cellular prion protein protects against reactive-oxygen-species-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med* **43**:959-67.
- Weibezahn J, Schlieker C, Tessarz P, Mogk A y Bukau B (2005) Novel insights into the mechanism of chaperone-assisted protein disaggregation. *Biol Chem* **386**:739-44.
- Weissmann C, Li J, Mahal SP y Browning S (2011) Prions on the move. *EMBO Rep* **12**:1109-17.
- Werner-Washburne M, Stone DE y Craig EA (1987) Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**:2568-77.
- Wickner S, Skowrya D, Hoskins J y McKenney K (1992) DnaJ, DnaK, and GrpE heat shock proteins are required in *oriP1* DNA replication solely at the RepA monomerization step. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10345-9.
- Wickner RB (1994) [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **264**:566-9.
- Wickner RB, Edskes HK, Roberts BT, Pierce MM, Baxa U y Ross E (2001) Prions beget prions: the [PIN<sup>+</sup>] mystery! *Trends Biochem Sci* **26**:697-9.
- Wickner RB, Edskes HK, Shewmaker F y Nakayashiki T (2007) Prions of fungi: inherited structures and biological roles. *Nat Rev Microbiol* **5**:611-8.
- Wickner RB, Masison DC y Edskes HK (1995) [PSI<sup>+</sup>] and [URE3] as yeast prions. *Yeast* **11**:1671-85.
- Willander H, Askarieh G, Landreh M, Westermarck P, Nordling K, Keranen H, Hermansson E, Hamvas A, Nogee LM, Bergman T, Saenz A, Casals C, Aqvistg J, Jornvall H, Berglund H, Presto J, Knight SD y Johansson J (2012) High-resolution structure of a BRICHOS domain and its implications for anti-amyloid chaperone activity on lung surfactant protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:2325-9.
- Wiltzius JJ, Landau M, Nelson R, Sawaya MR, Apostol MI, Goldschmidt L, Soriaga AB, Cascio D, Rajashankar K y Eisenberg D (2009) Molecular mechanisms for protein-encoded inheritance. *Nat Struct Mol Biol* **16**:973-8.
- Winkler J, Seybert A, Konig L, Pruggnaller S, Haselmann U, Sourjik V, Weiss M, Frangakis AS, Mogk A y Bukau B (2010) Quantitative and spatio-temporal features of protein aggregation in *Escherichia coli* and consequences on protein quality control and cellular ageing. *EMBO J* **29**:910-23.
- Wu C, Wang Z, Lei H, Duan Y, Bowers MT y Shea JE (2008) The binding of thioflavin T and its neutral analog BTA-1 to protofibrils of the Alzheimer's disease  $\beta$ (16-22) peptide probed by molecular dynamics simulations. *J Mol Biol* **384**:718-29.
- Yanisch-Perron C, Vieira J y Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-19.
- Yamashita Y, Hoshino T, Matsuda M, Kobayashi C, Tominaga A, Nakamura Y, Nakashima K, Yokomizo K, Ikeda T, Mineda K, Maji D, Niwano Y y Mizushima T (2010) HSP70 inducers from Chinese herbs and their effect on melanin production. *Exp Dermatol* **19**:e340-2.
- Yin H y Marshall D (2012) Microfluidics for single cell analysis. *Curr Opin Biotechnol* **23**:110-9.
- Yoshiike Y, Minai R, Matsuo Y, Chen YR, Kimura T y Takashima A (2008) Amyloid oligomer conformation in a group of natively folded proteins. *PLoS One* **3**:e3235.
- Zietkiewicz S, Lewandowska A, Stocki P y Liberek K (2006) Hsp70 chaperone machine remodels protein aggregates at the initial step of Hsp70-Hsp100-dependent disaggregation. *J Biol Chem* **281**:7022-9.
- Zhou HX, Rivas G y Minton AP (2008) Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annu Rev Biophys* **37**:375-97.
- Zhou P, Derkatch IL y Liebman SW (2001) The relationship between visible intracellular aggregates that appear after overexpression of Sup35 and the yeast prion-like elements [PSI<sup>+</sup>] and [PIN<sup>+</sup>]. *Mol Microbiol* **39**:37-46.
- Zzaman S, Reddy JM y Bastia D (2004) The DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system activates inert wild type pi initiator protein of R6K into a form active in replication initiation. *J Biol Chem* **279**:50886-94.

---

## **IX. MATERIAL SUPLEMENTARIO (PELÍCULAS)**

---

**Película S1** Microscopía *time-lapse*: Crecimiento de células *E.coli* MC4100 transformadas con los plásmidos pWH1-mCherry+ (opsp)<sub>18</sub> (**Figura 16**)

Las bacterias en crecimiento exponencial en medio rico LB son inmovilizadas en la superficie de un colchón de agar (ver procedimiento en Materiales y Métodos). Las películas muestran la superposición de imágenes, tomadas en contraste de fases y emisión de fluorescencia roja, de dos campos representativos.

(A) Células que sobreexpresan la proteína WH1(WT)-mCherry. Las imágenes individuales tomadas cada 10 minutos componen el video, comenzando 12 minutos después de la adición con IPTG y abarcando en total 2 horas y 10 minutos. Células libres de agregados se dividen de media 5 veces en 2 horas, mientras que cuando se expresa la proteína se expande el tiempo de generación 1.7 veces (3 rondas de división en 2 horas).

(B) Células que sobreexpresan la proteína variante WH1(A31V)-mCherry. Después de la adición del IPTG, las imágenes se tomaron cada 15 minutos. Las células que poseen inclusiones expanden el tiempo de generación 5 veces (una sola ronda de división en 2 horas). La subpoblación de células libres de carga amiloide proliferan hasta invadir el cultivo.

**Películas S2.** Canales microfluídicos: crecimiento de células MG1655 sobreexpresando la proteína RepA-WH1, cuyo gen está integrado en el cromosoma.

Las células en crecimiento exponencial y en medio mínimo M9 son inyectadas en el dispositivo microfluídico. Tras la deposición de las bacterias en los canales se procede a la inducción y visualización. Las películas están compuestas por imágenes tomadas en emisión de fluorescencia roja de campos cuyos canales son representativos. Las imágenes individuales están capturadas con un intervalo de 6 minutos.

(A) Células MG1655 expresando RepA-WH1(A31V)-mCherry por inducción con IPTG. El video abarca en total 70 horas de crecimiento, en el que se muestra un único campo compuesto por 20 canales. Las células, a lo largo de las generaciones, expresan dos tipos de partículas agregadas amiloides, esféricas-globulares o elongadas como “cometas” o “gusano” que confieren fenotipos diferentes en la proliferación celular, además de existir una interconversión activa entre ambos. El video empieza tras media hora del comienzo de la inducción.

Las películas B, C, D, E, F y G engloban 8 o más horas (máximo 18) de crecimiento celular y muestran canales representativos seleccionados.

(B) Efecto de la inhibición de DnaK en la manifestación del amiloide RepA-WH1(A31V). La miricetina, flavonoide que inhibe DnaK, se adiciona en el mismo momento de la inducción con IPTG. La inhibición de DnaK provoca que las células porten exclusivamente partículas globulares (color rojo). Engloba 10 horas de crecimiento, comenzando 30 minutos después de la adición del IPTG y la miricetina.

(C) Expresión del prionoide y la chaperona DnaK (desde un plásmido p15A) en MG1655. La sobreexpresión de DnaK por inducción con arabinosa se realiza a la vez que la inducción con IPTG. DnaK provoca la aparición exclusiva de agregados del tipo elongados (color amarillo en todos los canales y a lo largo del tiempo). Abarca 14 horas de crecimiento y comienza a los 75 minutos de la inducción con IPTG y arabinosa.

(D) Expresión del prionoide y la chaperona ClpB (desde un plásmido p15A) en MG1655 mediante la adición conjunta de IPTG y arabinosa. La sobreexpresión de ClpB no tiene un efecto destacable con respecto a la expresión aislada de RepA-WH1(A31V): poseen el mismo perfil intermitente de colores amarillo-rojo. Engloba 18 horas de crecimiento, comenzando a los 40 minutos de la inducción (IPTG/Ara).

(E) Expresión de la variante mutante RepA-WH1( $\Delta$ N37) en MG1655. La copia de este gen integrado en el cromosoma se induce también por IPTG. Genera agregados subpolares únicos que recuerdan a los cuerpos

de inclusión convencionales. Abarca 8 horas de crecimiento y comienza a los 40 minutos de inducción con IPTG.

(F) Colocalización del prionoide con IbpA. Esta chaperona, que es un marcador de cuerpos de inclusión, cuyo gen está integrado en el cromosoma de MG1655, es visualizada gracias a su fusión a la proteína verde fluorescente GFP (en verde), mientras que RepA-WH1(A31V) se muestra en rojo. La disposición celular de IbpA difiere de la distribución de los agregados amiloides, colocaliza exclusivamente en la superficie de las grandes inclusiones maduras que poseen algunas células madres fundadoras. Engloba 8 horas de crecimiento, comenzando 75 minutos después de la adición del IPTG.